



Hsp70 est un nouveau régulateur majeur de l'érythropoïèse empêchant le clivage du facteur de transcription GATA-1 par la caspase-3 au cours de la différenciation.

Jean-Antoine Ribeil

► To cite this version:

Jean-Antoine Ribeil. Hsp70 est un nouveau régulateur majeur de l'érythropoïèse empêchant le clivage du facteur de transcription GATA-1 par la caspase-3 au cours de la différenciation.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2010. Français. NNT : . tel-00451047

HAL Id: tel-00451047

<https://theses.hal.science/tel-00451047>

Submitted on 28 Jan 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS.DIDEROT (Paris 7)

ECOLE DOCTORALE : BIOLOGIE ET BIOTECHNOLOGIE

DOCTORAT

Discipline : Biologie des Cellules Sanguines

Antoine-Jean RIBEIL

**Hsp70 est un nouveau régulateur majeur de l'érythropoïèse
empêchant le clivage du facteur de transcription GATA-1
par la caspase-3 au cours de la différenciation**

Thèse dirigée par le Professeur Olivier HERMINE

Soutenue le : 25 Janvier 2010

Devant le jury composé de :

Le Pr. Yves Beuzard

Le Dr Patrick Auberger

Le Dr Jean-Luc Villeval

Le Dr Michel Morange

Le Pr. Olivier Hermine

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de Thèse



REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier Monsieur le Docteur Michel Dy, directeur de l'Unité CNRS UMR 8147, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire.

Mes remerciements vont tout particulièrement à Monsieur le Professeur Olivier Hermine, qui m'a donné ma chance et qui m'a fait confiance en m'accordant de réaliser ce travail de thèse, puis par la suite de développer à Necker la prise en charge clinique des patients adultes ayant une maladie de l'hémoglobine. Je le remercie pour son accueil, son aide précieuse ; que ce soit pour les idées novatrices ou pour ses conseils avisés, son exemple humain, médical et scientifique. Sa sympathie, son dynamisme, son enthousiasme, ses conseils, sa patience, son aide scientifique et personnelle ont été des atouts dans le bon déroulement de mon travail. Je le remercie aussi pour le cadre et l'environnement intellectuel qu'il m'a apporté aussi bien dans le laboratoire que dans le service d'Hématologie. Je tiens à le remercier pour le soutien et la confiance qu'il m'a accordés et son aide et son encouragement dans la poursuite de ma carrière. Je lui exprime toute ma reconnaissance. Qu'il accepte l'expression de ma réelle reconnaissance et de ma très grande admiration.

Je tiens à remercier Madame le Professeur Marina Cavazzana-Calvo et Monsieur le Professeur Bruno Varet, qui m'ont si gentiment permis de m'intégrer au sein de leur équipe médicale. Que Monsieur Varet soit assuré de mon profond respect et de ma sincère estime pour son soutien personnel et ses conseils. J'ai pu apprécier ses grandes qualités humaines, que je n'oublierai jamais. Je remercie également le Professeur Varet pour m'avoir permis de bénéficier de son enseignement, à travers la structure du service d'Hématologie Clinique et du laboratoire de recherche. Je remercie le Professeur Marina Cavazzana-Calvo de m'avoir permis de réaliser mon clinicat au sein du Département de Biothérapie, de m'avoir laissé la disponibilité de finir ce travail de thèse et de m'avoir donné la possibilité de développer à Necker l'activité de prise en charge clinique des patients adultes atteints d'une hémoglobinopathie.

Je tiens à remercier Mademoiselle le Docteur Yaël Zermati qui m'a encadré lors de mon DEA, qui m'a enseigné la rigueur nécessaire pour obtenir un travail de qualité en recherche fondamentale et qui surtout m'a transmis son scepticisme pour les dogmes et sa passion pour l'érythropoïèse...

Je remercie Monsieur le Professeur Yves Beuzard qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette Thèse. J'ai tout particulièrement apprécié son enseignement, sa rigueur scientifique, et son enthousiasme. Qu'il trouve ici l'expression de mon plus grand respect.

Je remercie Messieurs les Docteurs Patrick Auberger et Jean-Luc Villeval d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Merci pour l'intérêt qu'ils ont apporté à mon travail en le jugeant avec toute leur expertise. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Docteur Michel Morange qui m'a fait l'honneur de faire partie du jury de cette thèse. J'espère que ce premier contact sera poursuivi de réflexions communes ultérieures sur le décryptage du rôle des protéines chaperonnes au cours des phénomènes de différenciations cellulaires. Qu'il accepte l'expression de ma respectueuse gratitude.

Je souhaiterais remercier Madame le Dr Carmen Garrido et Monsieur le Professeur Eric Solary et leur équipe à Dijon, pour le rôle qu'ils ont joué dans nos travaux, de par leur expertise dans les domaines de l'apoptose et des heat shock protéines.

Un grand merci particulier à Michaël Dussiot et à Julie Vandekerckhove, pour s'être totalement impliqués aussi facilement dans le sujet et pour leur intégration harmonieuse dans l'équipe. Plus que notre relais à Yaël et moi, ils ont été le moteur qui nous a permis de finir cette belle histoire.

J'associe à mes remerciements Yves Lepelletier et Cécile Pouzet pour leur patience et leur aide considérable, en particulier pour les expériences de cytométrie de flux et d'imagerie confocale, ainsi qu'Ivan Moura et Odile Devergne pour leurs conseils et nos conversations instructives et stimulantes.

J'associe à mes remerciements Jean-Benoit Arlet, Bertrand Arnulf, Cédric Baude, Zakia Belaid-Choucair, Marion Carre, Séverine Coulon, Geneviève Courtois, Sophie Georgin-Lavialle, David Ghez, Jean-Philippe Herbeuval, Sébastien Jacquelin, Joëlle Kersual, Daniela Mendes-da-Cruz, Pierre Milpied, Amédé Renand, pour leur sympathie et leur disponibilité.

Je remercie Madame le Docteur Véronique Witko-Sarsat pour la qualité des nombreux échanges scientifiques et collaborations que nous avons. Qu'elle accepte l'expression de ma respectueuse gratitude.

Un grand merci à tous les membres actuels et passés de l'Unité, pour leur aide, leur patience et leur sympathie.

Je ne saurais oublier la Fondation pour la Recherche Médicale qui a financé mon DEA et l'Association pour la Recherche sur le Cancer qui m'a soutenu pendant mes deux années de Thèse au laboratoire.

Je remercie aussi toutes les femmes enceintes qui ont accepté de nous donner le sang de cordon à la naissance de leur enfant, ainsi que les équipes de la Maternité et du Département de Biothérapie de l'Hôpital Necker. Sans toutes ces personnes, faisant preuve de bonne volonté et de considération à l'égard de notre projet de recherche, nous n'aurions pu avoir les cellules primaires nécessaires à nos études.

Je souhaiterais aussi remercier le laboratoire d'Hématologie Biologique et en particulier Madame le Dr Françoise Valensi et Monsieur le Dr Vahid Asnafi pour leur expertise en cytologie et leur sympathie.

Je souhaiterais également remercier les membres du laboratoire de Marina Cavazzana-Calvo et en particulier Fabian Gross pour son expertise dans les transductions de cellules primaires, son aide et sa disponibilité.

Je souhaiterais aussi remercier mes Professeurs et mentors d'Hématologie Clinique de Reda Bouabdallah lors de mon externat, à Bernard Leduc, Dominique Bordessoule, Arnaud Jaccard, Pascal Turlure, Richard Delarue, François Lefrère de m'avoir fait partager leurs valeurs, leur amour de la médecine et de la science et de m'avoir soutenu dans mes projets d'étude.

Je pense aussi à mes collègues du département de Biothérapie, et en particuliers à Brigitte Bourgoïn et Michèle Lepetitcorps qui ont supporté, voir vécu mes angoisses pendant ces dernières années de clinicat.

Il m'est difficile de placer une limite à ces remerciements et de citer chaque personne qui a par ses encouragements, ses conseils, son aide, son intervention, ou de par le temps passé à relire ce manuscrit, contribué à ce travail. Aussi, que tous ceux qui ont, d'une façon ou d'une autre, participé au bon déroulement de cette Thèse, trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie aussi tous mes amis, pour leur présence à mes côtés, Jean-Christophe et Bérengère, Laurent et Sandrine, Gérald et Isabelle, Philippe. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde et sincère amitié.

Que ce travail soit une marque de reconnaissance envers mes parents, mon frère, ma famille qui m'ont toujours soutenu, encouragé et accordé leur soutien sans réserve. Merci d'avoir toujours eu confiance en moi, de m'avoir laissé mener à bien tous mes projets et de les avoir supportés, pendant ces longues années d'étude.

Magali : Tu as changé ma vie. Cette épreuve nous paraît un sommet, ce n'est qu'une étape de notre longue route.

Et enfin, un grand merci à la caspase-3 qui m'a fait rencontrer ma femme. Voilà un exemple vivant que le rôle de cette enzyme ne s'arrête pas à l'apoptose mais permet aussi la maturation !

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	p13
RESUME	p23
INTRODUCTION	p27

I. L'ÉRYTHROPOÏÈSE

I.A. Introduction	p29
I.B. Description de l'érythropoïèse chez l'homme adulte au niveau cellulaire	p29
I.B.1. Ontogénie	p29
I.B.2. Les cellules souches hématopoïétiques en amont de l'érythropoïèse	p31
I.B.3. Erythropoïèse précoce	p33
I.B.4. Erythropoïèse tardive	p35
I.B.4.1. Les différents stades de la maturation érythroïde terminale	p37
I.B.4.1.1. Le proérythroblaste	p37
I.B.4.1.2. Les érythroblastes basophiles	p37
I.B.4.1.3. Les érythroblastes polychromatophiles	p37
I.B.4.1.4. Les érythroblastes acidophiles	p38
I.B.4.1.5. Les réticulocytes	p38
I.B.4.1.6. Les érythrocytes ou globules rouges	p38
I.B.5. Etapes de la maturation terminale	p38
I.B.5.1. Rôle des cellules stromales dans la régulation de l'érythropoïèse	p38
I.B.5.2. Modifications morphologiques et structurales du noyau	p40
I.B.5.3. L'énucléation	p42
I.B.5.4. La maturation du réticulocyte en érythrocyte	p43

I.C. Description de l'érythropoïèse chez l'homme adulte au niveau transcriptionnel p44

I.C.1. Séquences en cis impliquées dans la régulation des gènes érythroïdes	p47
I.C.2. Facteurs de transcriptions régulant l'expression des gènes érythroïdes	p47
I.C.2.1. GATA-1 et GATA-2	p47
I.C.2.2. SCL/TAL-1 et son cofacteur LMO-2	p53
I.C.2.3. EKLF et SP1	p55
I.C.2.3. NF-E2	p56
I.C.2.4. c-Myb	p57
I.C.2.4. Gfi-1B	p57
I.C.2.5. ZBP-89 et Id2	p58

I.D Régulation de l'érythropoïèse p58

I.D.1. Régulation positive de l'érythropoïèse	p59
I.D.1.1. Régulation positive de l'érythropoïèse au niveau cellulaire	p59
I.D.1.1.1. Régulation hormonale de l'érythropoïèse en dehors de l'érythropoïétine	p59
I.D.1.1.2. Régulation de l'érythropoïèse par les facteurs de croissance	p61
I.D.1.1.2.1. Stem cell factor et c-kit	p61
I.D.1.1.2.2. L'érythropoïétine et son récepteur	p62
I.D.1.1.2.2.1. Expression du récepteur à l'érythropoïétine en dehors de l'hématopoïèse	p66
I.D.1.1.2.2.2. Expression hématopoïétique et structure du récepteur à l'érythropoïétine	p68
I.D.1.2. Régulation positive de l'érythropoïèse au niveau moléculaire	p71
I.D.1.2.1. Stem cell factor et c-kit	p71
I.D.1.2.2. L'érythropoïétine et son récepteur	p73
I.D.1.2.3. Synergie entre c-kit et le récepteur à l'érythropoïétine au niveau moléculaire	p73
I.D.1.2.2.1. Activation du récepteur à l'érythropoïétine et transduction du signal	p75
I.D.1.2.2.1.1. Liaison du ligand et activation de JAK2	p75
I.D.1.2.2.1.2. Phosphorylation des résidus tyrosines intracytoplasmiques	p77
I.D.1.2.2.1.3. Principales voies de signalisation du récepteur à l'érythropoïétine	p78
I.D.1.2.2.1.3.1. La voie STAT5a-b	p78
I.D.1.2.2.1.3.2. La voie PI3-Kinase/AKT-PKB	p84

I.D.1.2.2.1.3.3. La voie RAS-MAPKinase	p87
I.D.1.2.2.1.3.4. Les voies LYN et BTK	p90
I.D.1.2.2.1.3.5. Régulation par l'érythropoïétine du calcium intracellulaire	p91
I.D.2. Régulation négative de l'érythropoïèse	p91
I.D.2.1. Régulation négative de l'érythropoïèse au niveau cellulaire	p91
I.D.2.1.1. Stem cell factor et c-kit	p91
I.D.2.1.2. Production d'érythropoïétine	p91
I.D.2.1.3. Les cytokines, les récepteurs de morts et leurs ligands	p92
I.D.2.1.3.1. Régulation négative de l'érythropoïèse par Fas/FasL	p92
I.D.2.1.3.2. Rôle du TNF- α	p95
I.D.2.1.3.3. Rôle de TRAIL	p95
I.D.2.1.3.4. TWEAK et érythropoïèse	p96
I.D.2.1.3.5. Autres cytokines inhibitrices de l'érythropoïèse : Interféron- γ et TGF- β	p96
I.D.2.1.3.5.1. Interferon- γ	p96
I.D.2.1.3.5.2. Transforming Growth Factor Beta (TGF- β)	p97
I.D.2.1.3.5.3. Stromal Derived Factor-1 (SDF-1)	p97
I.D.2.2. Régulation négative de l'érythropoïèse au niveau moléculaire	p98
I.D.2.2.1. Régulation négative de la phosphorylation de c-kit	p98
I.D.2.2.2. Les voies de signalisation inhibitrices induites par l'érythropoïétine : le rétrocontrôle négatif de la signalisation de l'érythropoïétine	p98
I.D.2.2.2.1. La dégradation du récepteur à l'érythropoïétine	p98
I.D.2.2.2.2. L'activation des phosphatases	p98
I.D.2.2.2.3. Les protéines de la famille SOCS	p99
I.D.2.2.2.4. La protéine adaptatrice LNK et la modulation de l'activation du récepteur à l'érythropoïétine	p100
I.D.2.3. Régulation moléculaire de l'érythropoïèse par l'apoptose	p103
I.E. Rôle des caspases dans la différenciation érythroïde terminale	p103

II. L'APOPTOSE

II.A. Généralités sur l'apoptose	p105
II.A.1. Définition	p105
II.A.2. Description de l'apoptose	p106
II.A.2.1. Caractéristiques morphologiques	p106
II.A.2.2. Distinguer l'apoptose de la nécrose	p106
II.A.2.3. Mécanismes de l'apoptose	p109
II.A.2.3.1. Caractéristiques biochimiques	p109
II.A.2.3.1.1. Les principaux effecteurs de l'apoptose	p110
II.A.2.3.1.1.1. Les caspases	p113
II.A.2.3.1.1.1.1. Structure quaternaire des caspases	p113
II.A.2.3.1.1.1.2. Les cibles des caspases	p118
II.A.2.3.1.1.1.3. La régulation des caspases	p119
II.A.2.3.1.1.1.3.1. Les protéines inhibitrices de l'apoptose : IAPs	p119
II.A.2.3.1.1.1.3.2. Autres protéines régulatrices des caspases	p121
II.A.2.3.1.1.2. La famille Bcl-2	p123
II.A.2.4. Voies de signalisation de l'apoptose	p127
II.A.2.4.1. Voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort	p127
II.A.2.4.2. La voie mitochondriale ou voie intrinsèque	p129
II.A.2.4.3. Les autres voies d'activation de l'apoptose	p130
II.A.2.4.3.1. Le PIDDosome, complexe protéique activateur de la caspase-2	p130
II.A.2.4.3.2. L'inflammasome complexe activateur des caspases-1 et -5	p131
II.A.2.4.3.3. Voie du Réticulum Endoplasmique	p131
II.A.2.4.3.4. La voie Perforine/Granzyme	p131
II.A.2.4.4. La phase d'exécution de l'apoptose	p132
II.A.2.4.5. Morphologie des cellules apoptotiques	p133
II.A.3. Rôle physiologique de l'apoptose	p134
II.A.3.1. Rôle de l'apoptose au cours de l'érythropoïèse	p137
II.A.3.2. Rôle de l'apoptose dans les érythroblastes matures et les érythrocytes	p138
II.A.4. Rôle des caspases dans d'autres processus physiologiques que l'apoptose	p142

II.A.4.1. Implication des caspases dans les processus de différenciation cellulaire	p143
II.A.4.1.1. Caspases et différenciation avec énucléation	p143
II.A.4.1.1.1. Rôle des caspases dans la maturation terminale des érythroblastes	p145
II.A.4.1.2. Caspases et différenciation sans énucléation	p148
II.A.4.1.2.1. Rôle des caspases dans la différenciation des cellules hématopoïétiques	p149
II.A.4.1.2.1.1. Rôle des caspases dans la différenciation des monocytes en macrophages	p149
II.A.4.1.2.2. Rôle des caspases dans la différenciation mégacaryocytaire	p150
II.A.4.2. Rôle des caspases dans le système immunitaire et la réponse inflammatoire	p151
II.A.4.2.1. Caspases et immunité innée chez les mammifères	p152
II.A.4.2.2. Caspases et immunité adaptative chez les mammifères	p153
II.A.4.3. Rôle des caspases dans la prolifération cellulaire	p154
II.A.4.4. Rôle des caspases dans la mobilité cellulaire	p155
II.A.5. Mécanismes de résistance à l'apoptose des cellules en cours de différenciation lors de la phase d'activation des caspases	p156

II.B. Place de l'autophagie au cours de la différenciation érythroïde terminale **p159**

III. HSP70

III.A. Généralités sur les Heat Shock protéines	p162
III.B. Phylogénie des Hsp70	p164
III.C. Régulation de la synthèse d'Hsp70	p169
III.D. Structure d'Hsp70	p174
III.E. Propriétés d'Hsp70	p174
III.E.1. Folding	p174
III.E.2. Hsp et protéolyse	p177
III.E.3. Hsp70 et voies de l'apoptose	p178
III.F. Hsp et érythropoïèse	p186

BUT DU TRAVAIL	p189
-----------------------	-------------

RESULTATS	p193
------------------	-------------

-Article	p195
-----------------	-------------

Ribeil JA , Zermati Y, Vandekerckhove J, Cathelin S, Kersual J, Dussiot M, Coulon S, Cruz Moura I, Zeuner A, Kirkegaard-Sorensen T, Varet B, Solary E, Garrido C, Hermine O.
Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1.
Nature. 2007;445,102-5.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	p217
--	-------------

ANNEXES

p229

Annexe I :

Article 2

p233

Vandekerckhove J, [Ribeil JA](#), Zermati Y, Garrido C, Courtois G, Solary E, Hermine O.
Hsp70, guardian angel of GATA-1 during erythroid differentiation.

Médecine-Science. 2008, 24, 37-40.

Article 3

p239

[Ribeil JA](#), Zermati Y, Vandekerckhove J, Dussiot M, Kersual J, Hermine O.

L'érythropoïèse : un paradigme pour l'étude du rôle des caspases dans la mort et la différenciation cellulaire.

Journal de la Société de Biologie. 2005, 199, 219-31.

Annexe II :

Communications à des Congrès Internationaux

p255

BIBLIOGRAPHIE

p259

LISTE DES ABREVIATIONS

ABREVIATIONS

ABD	« ATPase Binding Domain »
Abl	Abelson
ACE	enzyme de conversion de l'angiotensine
ADN	Acide DéoxyriboNucléique
AGM	Aorte-Gonade-Mesonephro
AIF	« Apoptosis Inducing Factor »
ALAS2	Delta-Amino Levulinate Synthase 2
ALPS	« Auto-immune Lympho Proliferative Syndrome »
Apaf-1	« Apoptotic Protease Activating Factor-1 »
APLT	AminoPhosphoLipide Translocase
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ASC	« Associated Speck-like protein containing a CARD »
ASCO	« American Society of Clinical Oncology »
ASH	« American Society of Hematology »
ASK1	« Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 »
AT-1	récepteurs à l'Angiotensine II de type 1
ATP	Adénosine triphosphate
Bad	« Bcl2-associated agonist of cell death »
Bid	« BH3 interacting domain death agonist »
Bax	« Bcl2-associated X protein»
Bcl2	« B-Cell Lymphoma 2 »
Bcl6	« B-cell leukemia/lymphoma 6 »
Bcl-x_L	« B-cell lymphoma extra large »
Bcr	« Breakpoint cluster region »
Beta-Trcp	« Beta-Transducing repeat-containing protein »
BFU-E	« Burst Forming Unit-Erythroid »
BFU-E/Mk₂	« Burst Forming Unit-Erythroid and Megakaryocyte »
bHLH	« basic-Helix-Loop-Helix »
BIR	« Baculovirus IAP Repeats »
BMP-4	« Bone Morphogenetic Protein-4 »

bp	Paires de bases
BRUCE	« BIR Repeat-containing Ubiquitin-Conjugating Enzyme »
Btk	Bruton's tyrosine kinase
Ca²⁺	Ion calcium
CAD	« Caspase Activated Dnase »
CARD	« CASpase-Recruitment Domain »
Caspase	« Cysteinyl-aspartate-cleaving protease »
Cbl	« Casitas B-lineage lymphoma »
CBP	« CREB Binding Protein »
CD	Cluster de Différenciation
Cdkn1b	« Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 1b »
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>ced</i>	<i>C. elegans death</i>
C/EBPα	« Ccaat-enhancer-binding proteins α »)
Cellules ES	cellules souches embryonnaires
CFU-E	« Colony Forming Unit Erythroid »
CFU-GEMM	« Colony Forming Unit Granulocyte-Erythroid-Megakaryocyte-Makrophage »
CHIP	« C-terminus of Hsc70-Interacting Protein »
Cis	« Cytokine inducible SH2-containing protein »
c-kit	Récepteur au « Stem Cell Factor »
CLP	« Common Lymphoid Progenitor »
CMP	« Common Myeloid Progenitor »
c-mpl	Récepteur à la Tpo
c-Myb	« Myeloblastosis viral oncogene homolog (avian) »
COF	« Chromatin Occupancy Facilitator »
cPLA₂	« cytosolic Phospholipase A2 »
CREB	« cAMP Response Element Binding »
CrmA	« Cytokine response modifier A »
CTL	Lymphocyte T cytotoxique
CXCR4	« CXC chemokine Receptor 4 »
$\Delta\Psi_m$	Potentiel transmembranaire mitochondrial

DD	« Death Domain »
DED	« Death Effector Domain »
DISC	« Death Inducing Signaling Complex »
DNase II	DéoxyriboNucléase II
2,3 DPG	2,3 DiPhosphoGlycerate
EEC	« Erythroid Endogenous Colony »
EKLF	« Erythroid Kruppel-like Factor »
Emp	« Erythroblast macrophage protein »
Epo	Erythropoïétine
Epo-R	Récepteur à l'Epo
ERK	« Extracellular signal Regulated Kinase »
FADD	« Fas-Associated Death Domain »
FANCC	« Fanconi Anemia Complementation group C »
FGF	« Fibroblast Growth Factor »
FKHR	« Forkhead box O1 »
Fli-1	« Friend leukemia virus integration 1 »
FLIP	« FADD-Like ICE Inhibitory Proteins »
c-FLIP	FLIP cellulaire
v-FLIP	« viral FLICE-Inhibitory Protein »
Fn-14	« Fibroblast growth factor-inducible 14 »
FOG-1	« Friend Of GATA-1 »
Foxo3A	« Forkhead box O3A »
FVA	« Friend Virus Anemia inducing strain »
Gab1/2	« GRB2-associated binding protein »
GAS	« γ -IFN Activated Sequences »
G-CSF	« Granulocyte-Colony Stimulating Factor »
Gfi-1B	« Growth factor independent 1B »
GM-CSF	« Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor »
GMP	« Granulocyte-Makrophage Progenitor »
GPIX	Glycoprotéine IX
Gp130	Glycoprotéine 130
Gpa	Glycophorine A

GR	« Glucocorticoid Receptor »
GRB2	« Growth factor Receptor-bound protein 2 »
GSK3	« Glycogen Synthetase Kinase 3 »
GTP	Guanosine TriPhosphate
HAT	Histone Acétyle-Transférase
HIF	« Hypoxia Inducible Factor »
HLA	« Human Leukocyte Antigen »
HRI	« Heme Regulated Inhibitor of translation »
HSC	Cellules Souches Hématopoïétiques
Hsc70	« Heat Shock Cognate 70 »
HSE	« Heat Shock Element »
HSF	« Heat Shock Factors »
Hsp	« Heat shock proteins »
IAP	« Inhibitor of Apoptosis Protein »
ICAD	« Inhibitor of Caspase Activated DNase »
ICE	enzyme de conversion de l'interleukine-1alpha
Id	« Inhibitors of DNA binding »
IEC	Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IFN	Interféron
IGF-1	« Insulin-like Growth Factor-1 »
IKK	IKB kinase
IL	Interleukine
IRS-2	« Insulin Receptor Substrate-2 »
JAK2	Janus Kinase 2
JH	« JAK Homology »
JNK	c-Jun-NH ₂ -terminal Kinase
K⁺	Ion potassium
kb	Kilobase
LAL-T	Leucémies Aiguës Lymphoblastiques T
Lck	« Leukocyte-specific protein tyrosine kinase »
LCR	« Locus Control Region »
LMO-2	« LIM domain only 2 (rhombotome-like 1 »

Lin⁻	« Lineage negative »
LT-HSC	« Long-Term HSC »
Lyn	« Lck/yes-related novel tyrosine kinase »
Maf	« musculoaponevrotic fibrosarcoma oncogene homolog »
MAP	« Mitogen-Activated Protein »
MAPK	« Mitogen-Activated Protein Kinase »
M-CSF	« Macrophage Colony-Stimulating Factor »
MEKK1	MAP Kinase Kinase 1
MDS	Syndromes myélodysplasiques
MEL	« Murine ErythroLeukemia »
MENT	« Mature Erythrocyte Nuclear Termination stage-specific protein »
MEP	« Megakaryocyte-Erythroid Progenitor »
MGG	May Grunwald Giemsa
MPP	« MultiPotent Progenitor »
MST1	« Mammalian Sterile Twenty-like kinase »
NAIP	« Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein »
NEF	« Nucleotid Exchange Factor »
NES	« Nuclear Export Signal »
NF-E2	« Nuclear Factor Erythroid-derived 2 »
NF-KB	« Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells »
NGF	« Nerve Growth Factor »
NLR	« NOD-Like Receptor »
NLS	« Nuclear Localization Signal »
NuMA	« Nuclear-Mitotic Apparatus protein »
Nup	Nucleoporin
ORL	Otho-Rhino-Laryngée
PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymérase
PBD	« Peptid Binding Domain »
PCNA	« Proliferating Cell Nuclear Antigen »
PH	« Pleckstrine Homolog »
PHA	PhytoHémaglutinine
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase

PIDD	« P53-Induced protein with Death Domain »
PIP3	3' phospho-inositol
PKA	Protéine Kinase A
PKB	Protéine Kinase B
PKC	Protéine Kinase C
PKR	« Double-stranded RNA-dependent Protein Kinase »
PLC-γ	PhosphoLipase C- γ
PR3	Proteinase 3
PTP	Pore de Transition de Perméabilité (
RAIDD	« RIP-Associated ICH-1/CED-3-homologous protein with Death Domain »
RANKL	« Receptor Activator of NF-KB Ligand »
Ras	« Rous sarcoma kinase »
Rb	« Retinoblastoma protein »
RE	Réticulum endoplasmique
RIP	« Receptor-Interacting Protein »
siRNA	« Small Interfering RNA »
snRNPs	« small nuclear RiboNucleoProtein »
RON	Récepteur d'Origine Nantais
ROS	« Reactive Oxygen Species »
SAPK	« Stress-Activated Protein kinase »
SCF	« Stem Cell Factor »
SDF-1	« Stromal Derived Factor-1 »
SH2	Src Homology 2
SHIP	« SH2-containing Inositol Phosphatase »
SHP-1	« Small Heterodimer Partner-1 »
SOCS	« Suppressor Of Cytokine Signalling »
Sos 1	« Son of sevenless homolog 1 »
STAT	« Signal Transducer and Activator of Transcription »
ST-HSC	« Short-Term HSC »
Syk	« Spleen tyrosine kinase »
<i>T. thermophila</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>
T3	triiodothyronine

TAL-1	« T-cell acute lymphocytic leukemia 1 »
TCR	« T Cell Receptor »
TGF-β	« Transforming Growth Factor- β »
TIMP-1	« Tissue Inhibitor of MetalloProteinases-1 »
TNF	« Tumor Necrosis Factor »
TNF-R	« Tumor Necrosis Factor-Receptor »
Tpo	Thrombopoïétine
Tpr	« Translocated promoter region »
TRADD	« TNF Receptor-Associated Death Domain »
TRAIL	« TNF Related Apoptosis Inducing Ligand »
TRAIL-R	« TRAIL-Receptor »
TRPC	« Transient Receptor Potential Channel »
TWEAK	«Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis »
UBP	« Ubiquitin Binding Peptid »
VCAM-1/α_v integrine	« Vascular Cell Adhesion Molecule-1 »
VEGF	« Vasular Endothelial Growth Factor »
VHL	Von Hippel Lindau
VLA-4/ICAM-4	« Very Late Antigen-4/Inter Cellular »
XIAP	« X-linked mammalian Inhibitor »
ZBP-89	« Zinc finger Binding Protein of 89 kDa »

RESUME

RESUME

Hsp70 est un nouveau régulateur majeur de l'érythropoïèse empêchant le clivage du facteur de transcription GATA-1 par la caspase-3 au cours de la différenciation

La production de globules rouges dépend du taux apoptose des précurseurs érythroïdes et est principalement régulé par l'érythropoïétine (Epo). La privation en Epo aboutit à l'activation de la caspase-3 (casp-3) qui clive GATA-1 ce qui entraîne l'apoptose des érythroblastes immatures. L'activation de la casp-3 est également indispensable aux modifications morphologiques caractéristiques observées au cours de la différenciation érythroïde terminale humaine, sans qu'il n'y ait ni d'apoptose ni de clivage de GATA-1.

L'objectif de cette thèse était de mettre en évidence si Hsp70 inductible, dont un des rôles principaux est la régulation de l'apoptose, est impliquée dans la protection sélective des substrats de la casp-3 activée au cours de la différenciation érythroïde terminale humaine. Nous avons mis en évidence que lors de la différenciation érythroïde terminale pendant la phase d'activation des caspases, Hsp70 a une expression nucléo-cytoplasmique constitutive et co-localise avec GATA-1 dans le noyau. La localisation nucléaire d'Hsp70 est régulée par l'Epo : après privation des cellules en Epo, il y a une importante diminution de la localisation nucléaire d'Hsp70 et GATA-1 est clivée. L'inhibition de l'expression d'Hsp70 par une approche siRNA a comme conséquence le clivage de GATA-1 lors de l'activation de la casp-3 avec un arrêt de différenciation et une augmentation de la mort cellulaire.

Hsp70 est une nouvelle protéine anti-apoptotique de la différenciation érythroïde terminale. Nous proposons un modèle dans lequel l'Epo détermine le destin des érythroblastes (apoptose vs différenciation) en aval de la casp-3 en régulant la localisation nucléaire d'Hsp70.

Mots clés : Erythropoïèse, GATA-1, Hsp70, Caspase-3, Erythropoïétine

ABSTRACT

Hsp70 is a new major regulator of erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1.

Red blood cells production depends on apoptosis rate of erythroid precursors. This process is mainly regulated by the erythropoietin (Epo). Thus, Epo starvation results in caspase-3 (casp-3) activation and as a consequence GATA-1 is cleaved and apoptosis of immature erythroblasts occurs. Casp-3 activation is also absolutely required for the morphological changes that occur during normal human terminal erythroid differentiation. In this context, although that caspase-3 is activated, apoptosis and GATA-1 cleavage do not occur. **The aim of this thesis**, was to study if the inducible form of Hsp70 which is chaperon protein that play a major role as a modulator of apoptosis. Here, we show that inducible Hsp70 is constitutively expressed during human terminal erythroid differentiation, in both nuclear and cytoplasmic erythroblast compartments. Hsp70 and co-localizes with GATA-1 in the nucleus at the onset of caspases activation during terminal erythroid differentiation. Hsp70 nuclear localization is regulated by Epo: after Epo starvation, while Hsp70 nuclear localization is lost, GATA-1 is cleaved. Transfection of siRNA Hsp70, reduces significantly Hsp 70 expression, and is associated with GATA-1 cleavage at the onset of casp-3 activation occurring during erythroid differentiation. Hsp70 inhibition leads to stop differentiation and increase cell death.

Therefore, Hsp70 exerts a new critical anti-apoptotic role during terminal erythropoiesis. We propose a model in which, Epo determines the fate of erythroblasts (apoptosis vs. differentiation) downstream of casp-3 activation by regulating the nuclear localization of Hsp70.

Key words: Erythropoiesis, GATA-1, Hsp70, Caspase-3, Erythropoietin

INTRODUCTION

I. L'ÉRYTHROPOÏÈSE

I.A. Introduction

L'érythropoïèse est le processus permettant la production de globules rouges matures ou érythrocytes. Ces cellules, anucléées, de forme biconcave et dont le composant principal est l'hémoglobine, permettent le transport de l'oxygène dans tous les tissus de l'organisme. L'érythropoïèse est caractérisée par l'engagement d'une cellule souche hématopoïétique multipotente à l'origine de tous les éléments du sang (Figure E1) vers un progéniteur érythroïde qui, en se différenciant, va diminuer ses capacités de prolifération et aboutir à la formation d'érythrocytes. La production de globules rouges représente le plus haut rendement du système hématopoïétique, avec un taux de production estimé à 200 milliards d'érythrocytes par jour. Ce processus est finement régulé par l'effet combiné du microenvironnement et des facteurs de croissance qui permettent la survie, la prolifération et/ou la différenciation des progéniteurs érythroïdes, et de facteurs de transcriptions qui régulent la transcription de gènes impliqués dans l'acquisition du phénotype érythroïde. La durée de vie des globules rouges d'environ 120 jours implique une régulation fine et précise de leur production, afin de maintenir l'homéostasie du système. En cas de besoins accrus, l'érythropoïèse peut s'adapter et produire 7 à 8 fois plus d'érythrocytes.

I.B. Description de l'érythropoïèse chez l'homme adulte au niveau cellulaire

I.B.1. Ontogénie

Chez l'homme comme chez l'animal, le siège principal de l'érythropoïèse se modifie au cours de l'évolution ontogénique. Ainsi, au début de la vie embryonnaire, les premières hématies se forment dans les îlots sanguins du sac vitellin. Dans le deuxième mois de la gestation, ces grandes cellules nucléées sont progressivement remplacées par des cellules plus petites provenant d'une hématopoïèse hépatique. Dans les mois suivants, le foie et la rate deviennent les principaux lieux de production érythrocytaire. Ce n'est qu'à partir du cinquième mois que vont se développer les cavités des régions cartilagineuses centrales des os, siège définitif de l'érythropoïèse chez l'adulte (Orkin and Zon, 2008). En effet, chez l'homme adulte normal, l'érythropoïèse a lieu seulement dans la moelle osseuse.

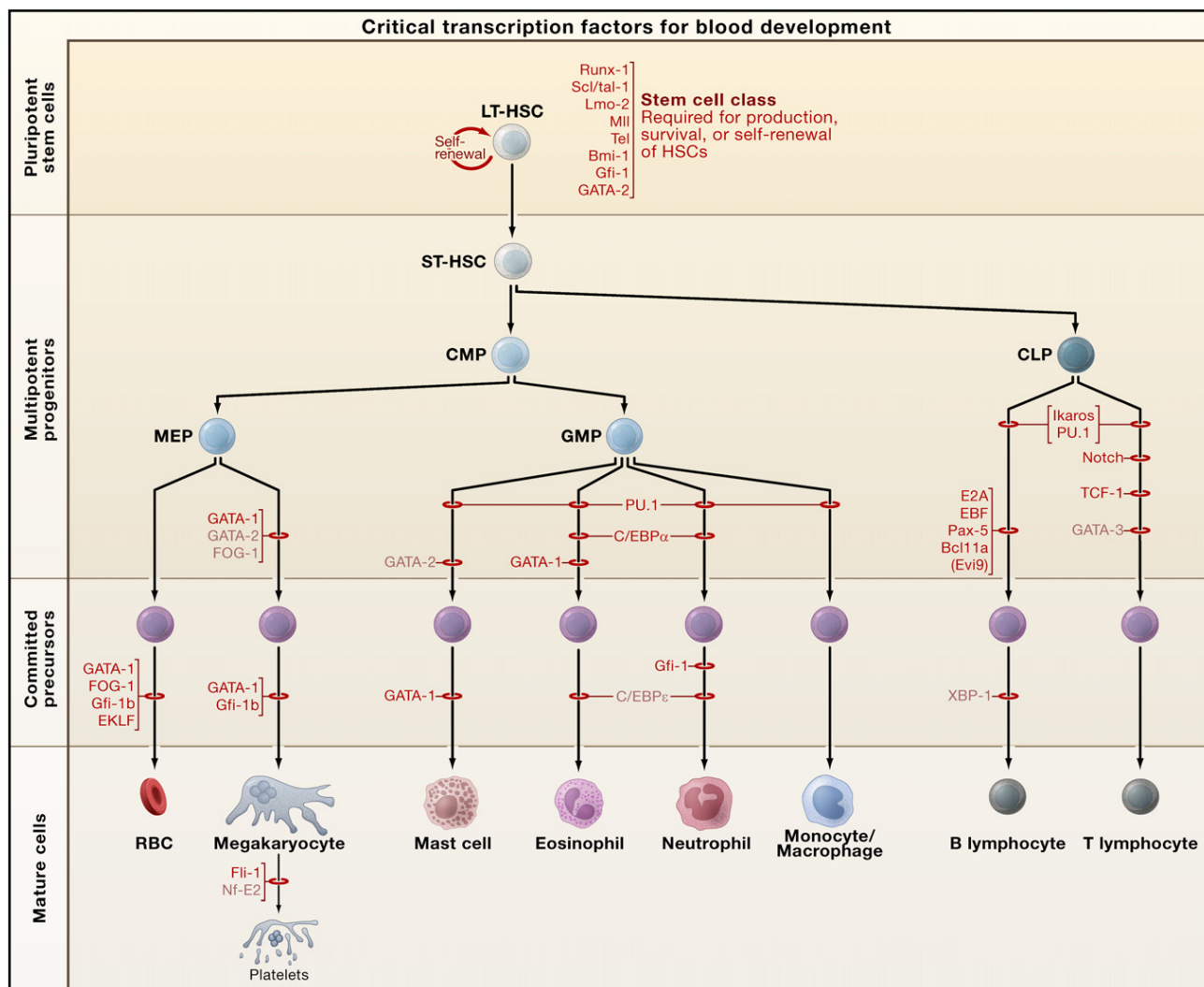


Figure E1: Représentation actuelle de l'hématopoïèse et principaux facteurs de transcriptions impliqués dans la différenciation hématopoïétique

(Schéma tiré de Orkin et Zon, 2008)

L'érythropoïèse est un processus de maturation cellulaire continue pouvant être schématiquement divisée en deux étapes :

1/ L'érythropoïèse précoce pendant laquelle une cellule souche hématopoïétique médullaire restreint sa multipotence et s'engage définitivement dans la voie de la lignée rouge. Cette phase correspond à l'activation d'un programme complexe de différenciation aboutissant à l'apparition de progéniteurs érythroïdes unipotents. Ces cellules représentent à peine 1% des éléments de la moelle normale et gardent cytologiquement l'aspect d'hémoblastes indifférenciés.

2/ L'érythropoïèse tardive correspond à la phase de maturation terminale de ces progéniteurs, sous la dépendance de l'érythropoïétine (Epo). Cette phase est marquée à la fois par l'acquisition des caractéristiques cytologiques et phénotypiques spécifiques de la lignée rouge et par une expansion massive et finement régulée du compartiment érythroïde jusqu'au stade réticulocytaire.

I.B.2. Les cellules souches hématopoïétiques en amont de l'érythropoïèse

L'hématopoïèse est habituellement décrite selon un modèle dit « hiérarchique » relativement rigide dans lequel la différenciation se fait par étapes successives correspondant à une restriction progressive des potentialités cellulaires.

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC, Hematopoietic Stem Cells), progéniteurs les plus précoces de l'hématopoïèse, sont peu nombreuses (environ 0,05% des cellules de la moelle osseuse et 1% des cellules du sang placentaire) et répondent à des critères précis. Ces cellules ont une capacité d'auto-renouvellement (Ema and Nakauchi, 2003) et sont pluripotentes (Kondo et al., 2003) (Szilvassy, 2003) . En effet, elles sont à l'origine de toutes les cellules matures et fonctionnelles composant le système hématopoïétique.

Chez la souris comme chez l'homme, l'antigène de surface CD34 (Cluster de Différenciation 34) est le marqueur de la population des HSC, mais est également exprimé à la membrane dans les progéniteurs précoces déjà engagés et dans les cellules endothéliales (Krause et al., 1996). Le compartiment des HSC est déterminé par la présence du CD34 et l'absence de marqueurs antigéniques des lignées lymphoïdes, myéloïdes et érythroïdes (lin⁻) (Lineage negative). Chez l'homme, l'antigène de surface CD38 est également utilisé pour définir la population des HSC, son absence dans les cellules CD34⁺lin⁻ correspondant au phénotype des HSC les plus précoces. Cependant, la culture de cellules lin⁻CD34⁻ *in vitro* ou *in vivo* entraîne la formation de cellules CD34⁺ ; ce qui suggère que les cellules CD34⁻ seraient en amont des cellules CD34⁺ (Kondo et al., 2003) (Guo et al., 2003) (Wognum et al., 2003). Les HSC humaines les plus primitives

seraient alors définies par une sélection négative d'antigène de surface ($\text{lin}^-\text{CD34}^-\text{CD38}^-$). Le marqueur CD133, exprimé dans les cellules humaines CD34^+ , peut alors être utilisé lors d'une sélection positive (Wognum et al., 2003).

Le compartiment des HSC peut être séparé en deux sous-populations distinguées selon leur capacité de reconstitution de l'hématopoïèse : les ST-HSC (« Short-Term HSC ») ont une capacité de reconstitution rapide mais inférieure à 6 mois, tandis que les LT-HSC (« Long-Term HSC »), dont la fréquence est très faible (1/2000 cellules dans la moelle osseuse), reconstituent de façon définitive l'hématopoïèse et sont considérées comme les véritables HSC (Kondo et al., 2003) (Szilvassy, 2003) (Yang et al., 2005) (Zhong et al., 2005) (Zhong et al., 1996).

En plus des LT-HSC et des ST-HSC (Figure E1), une autre sous-population appartenant au compartiment des HSC a été mise en évidence: les MPP (« MultiPotent Progenitors ») qui donnent naissance à des progéniteurs engagés soit dans la voie lymphoïde (CLP, « Common Lymphoid Progenitor ») soit dans la voie myéloïde (CMP, « Common Myeloid Progenitor »). L'entrée de ces cellules dans la différenciation hématopoïétique s'accompagne d'une restriction du potentiel de différenciation vers un lignage de plus en plus précis et d'une perte progressive du potentiel d'auto-renouvellement. Alors que la différenciation des CLP se fait directement dans un lignage donné (précurseurs des cellules T, B, dendritiques et NK), les CMP vont tout d'abord générer deux progéniteurs bipotents : les GMP (« Granulocyte-Macrophage Progenitors ») et les MEP (« Megakaryocyte-Erythroid Progenitors »). Les GMP vont donner naissance, d'une part, aux macrophages appartenant au lignage monocyttaire et d'autre part aux neutrophiles, éosinophiles et probablement aux basophiles et mastocytes appartenant au lignage granuleux. Les cellules dendritiques ne sont pas exclusivement dérivées de la lignée lymphocytaire et peuvent également se différencier à partir des GMP. Les MEP, quant à eux, donnent naissance aux lignées érythrocytaire et mégacaryocytaire (Figure E1).

Les mécanismes à l'origine de la détermination d'une cellule multipotente vers une lignée donnée sont encore imparfaitement compris et deux grandes « théories » se sont longtemps opposées (D'Andrea, 1994):

-La théorie instructive qui implique un rôle déterministe de l'environnement cellulaire sur le destin de la cellule souche, par le biais de facteurs de croissance et d'interactions entre la cellule hématopoïétique et son microenvironnement. Les facteurs de croissance peuvent activer un programme de différenciation spécifique d'une lignée donnée (Metcalf and Merchav, 1982) (Robb, 2007).

-La théorie stochastique (Till et al., 1964) selon laquelle les facteurs de croissance possèdent une fonction essentiellement « permissive » en apportant à la cellule des signaux de prolifération et de survie. La détermination cellulaire est ici dépendante de facteurs transcriptionnels qui activent un programme d'expression génique spécifique de chaque lignage et inhibent l'expression des gènes spécifiques des autres lignages (Pour revue, cf. (Orkin, 2000).

La différenciation érythroïde est spécifiquement sous la dépendance de l'Epo ; et il a été initialement évoqué que cette cytokine apportait aux progéniteurs multipotents un signal spécifique de différenciation vers la lignée rouge. De nombreuses publications au cours des 15 dernières années ont réfuté cette hypothèse et plaident en faveur du modèle stochastique plutôt que du modèle instructif, au moins en ce qui concerne l'érythropoïèse (Lacout et al., 2006) (Wu et al., 1995a) (Milot et al., 2001) (Pharr et al., 1994) (Socolovsky et al., 1997) (Goldsmith et al., 1998) (Semerad et al., 1999).

I.B.3. Erythropoïèse précoce

La maturation des différents progéniteurs érythrocytaires est un phénomène continu mais les différents stades de différenciation ont été artificiellement classifiés grâce à leur capacité à former, en culture de méthylcellulose, des colonies d'érythroblastes matures (Gregory and Eaves, 1978). Ces tests rétrospectifs permettent de caractériser les différents progéniteurs par leur taille, le temps et les facteurs de croissance nécessaires à l'obtention des colonies auxquelles ils donnent naissance. On peut schématiquement diviser la différenciation érythroïde de la façon suivante:

- Le CFU-GEMM (« Colony Forming Unit Granulocyte-Erythroid-Megakaryocyte-Macrophage ») est un progéniteur myéloïde multipotent à l'origine de colonies mégacaryocytaires, granulo-monocytaires et érythroïdes. Sur le plan immunologique, ces cellules expriment chez l'Homme l'antigène CD34, CD33, HLA-DR (HLA, « Human Leukocyte Antigen ») et le récepteur au « Stem Cell Factor » (SCF) c-kit.
- Le BFU-E/Mk (« Burst Forming Unit-Erythroid and Megakaryocyte ») est un progéniteur possédant la double potentialité érythroïde et mégacaryocytaire. Ce progéniteur correspond au MEP décrit chez la souris. L'existence d'un tel précurseur se base sur plusieurs arguments : de nombreuses lignées leucémiques, telles que UT7 ou K562 se caractérisent par la co-expression de marqueurs des deux lignages (Tabilio et al., 1984) (Papayannopoulou et al., 1988) (Rowley et al., 1992). Les expériences d'inactivation génique chez la souris ont montré que les facteurs de transcription tels que GATA-1 ou Gfi-1B (« Growth factor independent 1B »), jouant un rôle majeur dans la différenciation érythroïde, étaient tout aussi impliqués dans la mégacaryopoïèse

(Pevny et al., 1991) (Saleque et al., 2002). Chez l'Homme, ce précurseur bipotent, présent dans la fraction $CD34^+/CD38^{low}$ de la moelle osseuse, donne des colonies de petite taille constituées d'érythroblastes et de quelques mégacaryocytes en 12 jours de culture en présence de Thrombopoïétine (Tpo), d' Interleukine -3 (IL-3), d'IL-6, de SCF et d'Epo (Debili et al., 1996).

- Le BFU-E immature (« Burst Forming Unit-Erythroid ») est le premier progéniteur irréversiblement engagé dans la lignée érythroïde. Il est obtenu en 15 jours de culture en milieu semi-solide chez l'Homme, en donnant de grosses colonies érythroïdes contenant plusieurs milliers d'érythroblastes matures. Ces cellules représentent 0,03% des cellules hématopoïétiques médullaires et seulement 40% des BFU-E sont en cycle et prolifèrent (Iscoe, 1977). Leur phénotype est $CD34^+ CD33^+ HLA-DR^+$ et $c-kit^+$. Il est dépendant du SCF et d'autres facteurs de croissance hématopoïétiques pour leur prolifération et leur différenciation. Il n'exprime pas ou peu le récepteur à l'Epo : Epo-R. En effet, Les souris $Epo^{-/-}$ possèdent une quantité normale de BFU-E immatures. L'insensibilité de ces BFU-E à l'Epo chez l'Homme reste à nuancer, l'administration de doses fortes d'Epo entraînant une augmentation du nombre et de l'index mitotique de ces progéniteurs (Dessypris et al., 1988).

- Le BFU-E mature est observé chez l'Homme après 10 jours de culture en présence d'IL-3, de SCF et d'Epo. A ce stade, les cellules n'expriment plus le CD33 tandis que l'Epo-R apparaît à leur surface.

- Les CFU-E (« Colony Forming Unit Erythroid ») sont les progéniteurs les plus matures qui, en 7 jours de culture en méthylcellulose en présence d'Epo, vont donner de petites colonies d'érythroblastes. Les CFU-E représentent 0,3% des cellules hématopoïétiques médullaires et la plupart d'entre elles sont en cycle et prolifèrent (Iscoe et al., 1974). Ces cellules n'expriment plus les marqueurs d'immaturité CD34 et DR, mais expriment à leur surface Epo-R, le CD36, le récepteur à la transferrine CD71, puis ultérieurement la glycophorine A (Gpa) dont l'expression augmente au fur et à mesure de la maturation érythroïde terminale. En revanche, l'expression de $c-kit$ diminue à ce stade. Sur un frottis médullaire, ces différents précurseurs ne représentent qu'un faible pourcentage des cellules nucléées (1% environ), et ne possèdent aucun caractère cytologique propre qui permette de les identifier en May Grünwald-Giemsa (MGG). Ils se présentent comme de simple hémoblastes, cellules de taille moyenne à haut rapport nucléocytoplasmique contenant une chromatine fine.

Ensuite, les CFU-E vont donner les érythroblastes qui sont reconnaissables à leurs morphologies et qui acquièrent des modifications phénotypiques caractéristiques de la différenciation érythroïde terminale.

I.B.4. Erythropoïèse tardive

L'érythropoïèse tardive correspond ainsi à l'ensemble des modifications morphologiques et fonctionnelles aboutissant en six jours environ, à partir d'un CFU-E, à la production d'un globule rouge mature ou érythrocyte. L'ensemble de ces cellules constitue la lignée érythroblastique proprement dite et représente 20 à 30% des cellules nucléées d'une aspiration médullaire. Sur le plan anatomique, elle a lieu chez l'homme adulte dans la moelle osseuse, au sein d'une structure particulière : l'îlot érythroblastique, contenant en son centre un macrophage nourricier.

La maturation entre le premier stade identifiable (proérythroblaste) et le réticulocyte s'accompagne d'une expansion cellulaire assurée par quatre mitoses successives. Au cours de la différenciation érythroïde, un index élevé de prolifération est observé au stade CFU-E/proérythroblastes. L'index de prolifération diminue rapidement dans les étapes terminales de la maturation jusqu'au stade polychromatophile à partir duquel les mitoses s'arrêtent (Gregory and Eaves, 1978).

Bien que ces différents stades ne soient pas phénotypiquement séparables, la différenciation érythropoïétique entraîne l'évolution de l'expression des antigènes de surface (GpA ou CD235a, récepteur à la transferrine : CD71, c-kit : CD117, CD34, CD111, et CD36) (Belaaloui et al., 2003) (Okumura et al., 1992) (Figure E2).

La classification des stades érythroblastiques repose sur plusieurs critères fournis par l'observation au microscope optique de frottis colorés au MGG : taille cellulaire, rapport nucléocytoplasmique, basophilie du cytoplasme et surtout arrangement de la chromatine qui se condense au fur et à mesure de la maturation. Au cours de ce processus, il y a une réduction progressive du volume cellulaire, le noyau diminuant de volume plus rapidement que la cellule entière. Enfin, le noyau est exclu. Le cytoplasme des cellules jeunes est intensément basophile et devient progressivement acidophile. Cela s'explique par une diminution progressive d'acides ribonucléiques responsables de la basophilie, doublée de l'apparition progressive de l'hémoglobine, qui donne au cytoplasme cette affinité pour l'éosine.

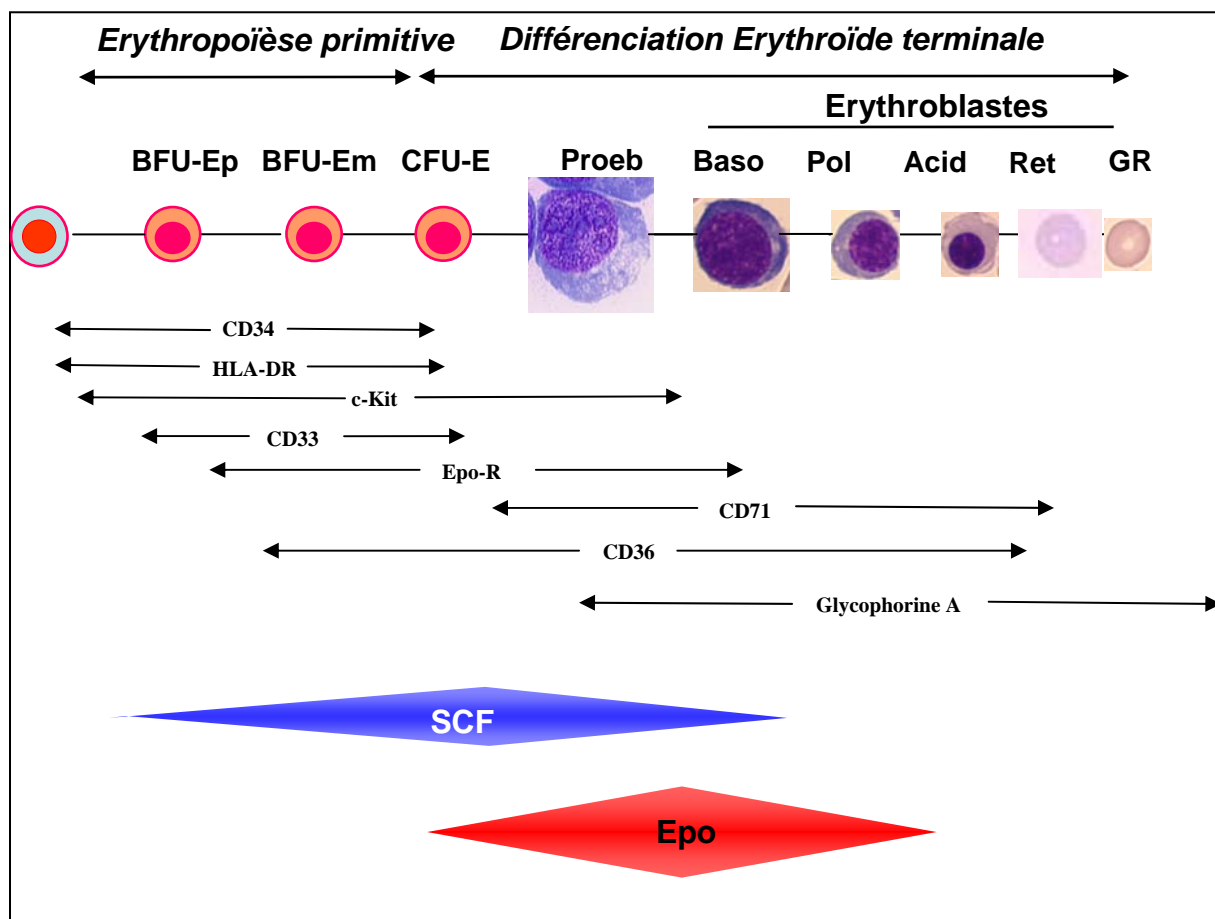


Figure E2 : L'érythropoïèse : processus par lequel les cellules souches hématopoïétiques multipotentes se différencient en globules rouges matures

On distingue ainsi, par ordre de maturité croissante : le proérythroblaste, l'érythroblaste basophile, l'érythroblaste polychromatophile, l'érythroblaste acidophile, le réticulocyte, l'érythrocyte qui est une cellule anucléée (Figure E2). Les érythroblastes sont classés en deux grandes catégories: immatures et matures. Du stade proérythroblaste au stade érythroblaste basophile, on considère que les érythroblastes sont immatures. A partir du stade érythroblaste polychromatophile, les érythroblastes sont dits matures.

I.B.4.1. Les différents stades de la maturation érythroïde terminale

I.B.4.1.1. Le proérythroblaste

Le proérythroblaste est une cellule rare, représentant environ 0,5 % des cellules médullaires. C'est une cellule de grande taille (25 à 28 μm de diamètre), arrondie ou légèrement ovale, au rapport nucléocytoplasmique élevé (autour de 0,8). La chromatine est fine mais moins homogène que celle des blastes indifférenciés et tend à se regrouper en amas. On observe un ou deux nucléoles peu nets. Le cytoplasme est réduit à une mince couronne périnucléaire dont la basophilie intense « bleu de Prusse » est caractéristique.

I.B.4.1.2. Les érythroblastes basophiles

Ils représentent de 2 à 4% des cellules médullaires. Leur diamètre est de 16 à 18 μm . Ce sont des cellules arrondies et bien limitées. La structure chromatinienne se condense en mottes hexagonales ou pentagonales très foncées en MGG et fréquemment disposées en rayon. Le nucléole disparaît. Le cytoplasme reste profondément basophile et encore plus que celui du proérythroblaste. L'hémoglobine commence à y être synthétisée. Ces cellules prolifèrent et donnent naissance au premier stade d'érythroblastes matures : les érythroblastes polychromatophiles.

I.B.4.1.3. Les érythroblastes polychromatophiles

Ces cellules sont caractérisées par l'accumulation progressive d'hémoglobine dans leur cytoplasme qui perd sa basophilie profonde. La taille de ces cellules est nettement inférieure à celle des érythroblastes basophiles (9 à 12 μm) en raison, essentiellement, de la réduction du volume nucléaire. La cellule reste bien ronde avec un noyau central ayant une chromatine en mottes très denses toujours en forme de « rayons de roue ». La quantité d'hémoglobine présente dans le cytoplasme augmente, celui-ci devient de ce fait moins basophile et s'éclaircit pour prendre une coloration violet clair. Ce sont les derniers érythroblastes ayant la capacité de proliférer.

I.B.4.1.4. Les érythroblastes acidophiles

Dernier stade nucléé de la maturation érythroblastique, le stade acidophile se caractérise par la petite taille des cellules (8 à 9 μm), par un noyau devenu pycnotique et rond qui s'excentre progressivement, constitué de 2 à 4 blocs chromatinien extrêmement compacts. Le cytoplasme désormais rempli d'hémoglobine apparaît rose-orangé clair. De l'expulsion nucléaire naît le réticulocyte.

I.B.4.1.5. Les réticulocytes

Ce sont des cellules anucléées, acidophiles et de forme irrégulière. De taille légèrement plus grande que l'hématie mature (>100 femto litres) et qui contient encore des ribosomes dessinant un réseau lâche bien visible après coloration par le bleu de Crésyl. Ces cellules quittent la moelle osseuse et passent dans le sang où elles vont maturer pendant 2 à 3 jours avant de devenir enfin un globule rouge.

I.B.4.1.6. Les érythrocytes

Le globule rouge normal est une cellule anucléée ayant la forme d'un disque biconcave. Il a une forme régulière de 7,5 μm environ. Son cytoplasme est acidophile. Aucune organelle n'est présente dans l'érythrocyte mature. L'hémoglobine représente le tiers de la masse du globule rouge. Il contient aussi de l'eau, des ions (K^+ notamment), du glucose et des enzymes. Toute anomalie de la taille ou de la forme des érythrocytes entraîne une anémie. Les érythrocytes non conformes ne pouvant se déformer pour passer dans les capillaires les plus fins et assurer leur fonction, sont éliminés par la rate.

I.B.5. Etapes de la maturation terminale

I.B.5.1. Rôle des cellules stromales dans la régulation de l'érythropoïèse

L'érythropoïèse nécessite l'établissement d'unités anatomiques distinctes appelées îlots érythroblastiques et localisées dans le foie fœtal, la moelle osseuse et également la rate chez la souris. Les îlots érythroblastiques sont des niches spécialisées dans lesquelles les précurseurs prolifèrent, se différencient et expulsent leur noyau et sont composées par une cellule macrophagique centrale qui émet de nombreux pseudopodes venant entourer les érythroblastes disposés en couronne autour d'elle (Allen and Dexter, 1982) (Chasis and Mohandas, 2008). Cette organisation cellulaire est un élément essentiel de la maturation terminale des érythroblastes. Elle assure une triple fonction de : 1) Régulation de la croissance et de la différenciation érythroblastique, 2) Epuration des déchets, en particulier, élimination des noyaux expulsés des érythroblastes acidophiles ou des érythroblastes abortifs en cas d'érythropoïèse inefficace, 3)

Régulation de la mort cellulaire par apoptose des précurseurs érythroïdes. Le fer, nécessaire à la synthèse d'hémoglobine, et lié à la transferrine, est fourni par les macrophages de la moelle osseuse après phagocytose et recyclage du fer de l'hémoglobine contenu dans les érythrocytes âgés (ou sénescents).

Historiquement, la protéine Emp (« Erythroblast macrophage protein ») a été la première molécule identifiée comme capable de former une liaison homophile macrophage/érythroblaste. Les fœtus murins Emp-null meurent d'une anémie sévère montrant que Emp joue un rôle essentiel dans l'érythropoïèse (Soni et al., 2006) (Hanspal et al., 1998). Les interactions entre VLA-4/ICAM-4 (Very Late Antigen-4) (InterCellular Adhesion molecule-4) (Lee et al., 2006b) et VCAM-1/ α_v intégrine (« Vascular Cell Adhesion Molecule-1 ») (Sadahira et al., 1995) entre les érythroblastes et le macrophage central contribuent à l'intégrité de l'îlot. Ces protéines permettent la cohésion anatomique de l'îlot érythroblastique; l'invalidation de leur gène chez la souris entraînant une diminution plus ou moins marquée de la formation de ces îlots ainsi que, parfois, une inhibition de l'érythropoïèse terminale. L'intégrité de la structure des îlots met en jeu également des interactions entre les érythroblastes et la matrice extracellulaire par l'intermédiaire d'intégrines (Simmons et al., 1992).

L'îlot érythroblastique est un élément essentiel de la régulation de l'érythropoïèse *via* l'activation des récepteurs de mort cellulaire présents à la surface des érythroblastes (Chasis and Mohandas, 2008) (cf. infra). La prolifération érythroblastique est accentuée au contact de macrophages indépendamment de la concentration en Epo et résulte d'une diminution de la durée de la phase G0/G1 (Rhodes et al., 2008).

Il a récemment été décrit que la DNase II (DésoxyriboNucléase II) serait impliquée dans la maturation érythroïde et particulièrement dans le processus d'énucléation en fin de différenciation érythroïde. Chez la souris, la DNase II, présente dans les lysosomes du macrophage, est responsable de la dégradation de l'ADN (Acide DéoxyriboNucléique) après expulsion du noyau de l'érythroblaste (Kawane et al., 2001), comme c'est le cas lors de la phagocytose des cellules apoptotiques. Les souris déficientes en DNase II meurent d'anémies sévères associées à la présence d'érythroblastes nucléés circulants qui ne sont normalement observés que dans la moelle osseuse. Les macrophages centraux des îlots érythroblastiques représentent une source de DNase II et sont ensuite responsables de la phagocytose des noyaux expulsés par la reconnaissance des phosphatidylsérines à leur surface (Yoshida et al., 2005).

Des anomalies de la différenciation macrophagique peuvent avoir des conséquences sur la fonction des îlots érythroblastiques et affecter la différenciation érythroïde. La protéine Rb (Retinoblastoma protein), qui joue un rôle régulateur dans la différenciation macrophagique, est nécessaire à la maturation érythroïde. L'inactivation du gène Rb dans les souris entraîne une mort embryonnaire avec une anémie causée par un défaut d'énucléation (Clarke et al., 1992) (Jacks et al., 1992) (Lee et al., 1992). La protéine Rb joue aussi un rôle intrinsèque au cours de la différenciation érythroïde terminale lors de la phase d'arrêt du cycle cellulaire : son absence induit une érythropoïèse inefficace avec un blocage de la différenciation entre l'érythropoïèse précoce et tardive (Sankaran et al., 2008).

I.B.5.2. Modifications morphologiques et structurales du noyau

Au cours de la maturation de l'érythroblaste, on observe une réduction de la taille du noyau, une disparition des nucléoles et une condensation de la chromatine concomitantes à l'arrêt du cycle cellulaire et de la réplication de l'ADN. La condensation de la chromatine commence lors de la différenciation des érythroblastes basophiles, phénomène qui se poursuit et s'accroît lors de la différenciation en érythroblastes acidophiles. La condensation de la chromatine est associée à la répression des gènes contenus dans les portions d'ADN condensé. Ainsi, au cours de la différenciation terminale des érythroblastes, une extinction progressive de la plupart des gènes est observée. Cette diminution de la taille du noyau implique un remaniement de l'architecture de la membrane nucléaire. Ces changements morphologiques sont à rapprocher de ceux que l'on observe dans l'apoptose (cf. chapitre II). Au cours de la différenciation, l'ADN est clivé et de grands fragments d'ADN de 50 à 200 kb (kilobase) sont générés sans qu'il survienne une fragmentation internucléosomale de l'ADN comme lors de l'apoptose (Morioka et al., 1998). Plusieurs observations indiquent que l'activation des caspases (« cysteinyl-aspartate-cleaving protease ») est impliquée dans le processus de maturation érythroïde et pourraient jouer un rôle important dans ce phénomène (Gregoli and Bondurant, 1999) (Carlile et al., 2004; Zermati et al., 2001). Il a été précédemment mis en évidence, dans le laboratoire, qu'au cours de la différenciation érythroïde terminale, la caspase-3 est activée de façon transitoire au moment où les changements morphologiques des érythroblastes apparaissent et pourraient expliquer les modifications cellulaires observées au cours de la maturation terminale (Zermati et al., 2001). L'activation de la caspase-3 est associée à l'activation de la caspase-6 et au clivage de la Lamine B, protéine de la lamina nucléaire associée à la fois à la chromatine et à la membrane nucléaire et pourrait être responsable de la condensation du noyau comme cela a été décrit au cours de

l'apoptose (Morioka et al., 1998; Takahashi et al., 2000) (Paddy et al., 1990). De plus, la protéine Acinus, responsable de la condensation de la chromatine mais pas de sa dégradation, est activée par le clivage de la caspase-3 au cours de la différenciation érythroblastique (Sahara et al., 1999). En revanche, bien que les caspases exécutrices soient activées, les cellules n'entrent pas en apoptose puisqu'elles n'expriment pas de phosphatidylsérines à leur membrane, ICAD (« Inhibitor of Caspase Activated DNase ») n'est pas clivé et reste associé à CAD (« Caspase Activated DNase ») en inhibant son activité de fragmentation de l'ADN, AIF (« Apoptosis Inducing Factor ») n'est pas transloqué dans le noyau (Hristoskova et al., 2007) et GATA-1 n'est pas dégradé (Zermati et al., 2001) (cf. Chapitre II.A.4.1.1.1.). Lors de la culture érythroïde, l'inhibition des caspases juste avant leur phase d'activation par un agent comme le z-VAD (Zermati et al., 2001), ou par ARN interférence (siRNA (« Small Interfering RNA ») spécifique de la caspase-3 (Carlile et al., 2004), entraîne un blocage de la différenciation érythroïde au stade basophile. Ces données ont aussi été confirmées dans les érythroblastes murins. Dans ce modèle, il a été montré que l'hyper-expression de Raf-1, qui prévient l'activation des caspases, empêche la maturation érythroïde en inhibant la différenciation induite par les caspases. Un phénomène opposé est observé dans les souris Raf-1^{-/-} (Kolbus et al., 2002).

Par ailleurs, la distribution des protéines appartenant à différents sous-compartiments nucléaires a été étudiée dans des érythroblastes isolés de souris infectées par la souche anémiant du virus de Friend (FVA, « Friend Virus Anemia inducing strain ») (Krauss et al., 2005). Ces travaux ont montré, pendant la phase tardive de l'érythropoïèse, des résultats contradictoires concernant le clivage de la Lamine B, mais ont mis en évidence des phénomènes de redistribution des protéines des pores nucléaires (Nup153, Tpr, Nup62, Nup358) (Nup, Nucléoporine) (Tpr « Translocated promoter region ») alors que des protéines majeures de la matrice nucléaire comme NuMA (« Nuclear-Mitotic Apparatus protein ») et des facteurs d'épissage tels que les snRNPs (« small nuclear RiboNucleoProtein ») demeurent. Cette réorganisation permet le maintien de la transcription d'un certain nombre d'ARN comme ceux des globines α et β ou de Bcl-x_L (« B-cell lymphoma extra large ») et leur export nécessaire à la poursuite du processus de différenciation. Sur le même modèle, il a également été mis en évidence récemment que la condensation de la chromatine au cours de la différenciation érythroïde terminale dépendrait de la méthylation et de la désacétylation de certaines histones. Le traitement des cellules par un inhibiteur des histones désacétylases bloquerait la condensation de la chromatine et l'expulsion du noyau (Popova et al., 2009). Chez le poulet, la protéine MENT (« Mature Erythrocyte Nuclear Termination stage-

specific protein »), peu exprimée dans les érythroblastes immatures, est synthétisée au cours de la maturation érythroblastique, parallèlement à l'accroissement de la condensation de la chromatine à laquelle elle participe en coopération avec l'histone H5 (Grigoryev and Woodcock, 1993) (Grigoryev et al., 1992). Dans un autre modèle d'érythroleucémie murine (MEL, « Murine ErythroLeukemia »), il avait été suggéré que la déphosphorylation de l'histone « linker » H1 était nécessaire aux modifications de la chromatine (Yellajoshiyula and Brown, 2006). D'autres molécules comme les polyamines, que l'on trouve liées à la chromatine hautement condensée et généralement décrites comme essentielles à la différenciation et à la prolifération, s'associent à l'ADN au cours de la maturation des érythroblastes et semblent participer à la condensation de la chromatine (Koch et al., 1988).

Il a également été suggéré que p53 aurait une fonction possible pendant les dernières étapes de la différenciation. En effet, une expression importante de p53 est observée dans les érythroblastes acidophiles ; cette activation pourrait être associée à la dégradation nucléaire qui s'effectue à ce stade, sans l'exécution complète du processus apoptotique, en raison de la décroissance de l'activité des caspases (Peller et al., 2003).

I.B.5.3. L'énucléation.

Chez certains animaux (les oiseaux, l'embryon de certains rongeurs), l'expulsion du noyau ne se produit pas et les érythrocytes sont nucléés. Chez l'homme, la présence du noyau dans les érythrocytes circulants traduit toujours une pathologie (myélofibrose, par exemple) ou est secondaire à une augmentation brutale de l'érythropoïèse, comme c'est le cas au cours d'hémorragie ou d'hémolyse. Par contre, aucune pathologie constitutionnelle s'accompagnant d'absence d'énucléation n'est connue, soulignant l'importance de ce phénomène pour une bonne hémodynamique.

A la fin de la maturation de l'érythroblaste, on observe une migration du noyau à la périphérie de la cellule et un bourgeonnement de la membrane. L'observation au microscope électronique montre que le noyau est entouré par une membrane plasmique intacte et relié au réticulocyte par une fine extension membranaire. A cette étape, la composition de la membrane plasmique change et s'enrichit en concanavaline A dans sa région périnucléaire (Geiduschek and Singer, 1979). Les protéines de membrane sont alors redistribuées sur le réticulocyte en laissant le noyau dépourvu d'éléments squelettiques (Koury et al., 1989a). Une étude de la Gpa, à ce stade, suggère que la force de sa liaison au squelette par l'intermédiaire de protéines comme l'ankyrine ou la bande 3 détermine sa redistribution sur le réticulocyte (Lee et al., 2004). Celui-ci perd

progressivement son affinité pour le macrophage alors que le noyau y reste fixé. Une exposition à une faible force physique est alors capable de rompre cette connexion et de libérer le réticulocyte dans le flux sanguin. Après son expulsion, le noyau expose rapidement à sa surface des phosphatidylsérines qui constituent un signal de phagocytose par les macrophages. Il semble qu'à ce stade, le noyau contienne un taux d'ATP (Adénosine TriPhosphate) très faible et une concentration en ion calcium (Ca^{2+}) élevée. Ces perturbations pourraient inactiver l'APLT (AminoPhosphoLipide Transférase) et activer la scramblase, entraînant une relocalisation des phosphatidylsérines (Yoshida et al., 2005). L'invalidation du gène *Emp* a montré que cette protéine est indispensable à l'énucléation (Soni et al., 2006). En effet, les embryons *Emp*^{-/-} meurent au dix-neuvième jour du développement avec des altérations importantes des lignées érythroïde et macrophagique. On retrouve dans le sang des embryons *Emp*^{-/-} un nombre important d'érythrocytes immatures nucléés alors qu'aucun îlot érythroblastique n'est observé dans le foie fœtal. Ces érythroblastes peuvent toutefois se fixer aux macrophages de type sauvage, mais restent incapables d'énucléation. La protéine *Emp* est associée à l'Actine F, dont la polymérisation est indispensable à l'énucléation (Yoshida et al., 2005). Son absence pourrait expliquer les altérations de la distribution de l'Actine dans les érythroblastes *Emp*^{-/-} et le défaut d'énucléation. Chez la souris, la DNase II est responsable de la dégradation de l'ADN après expulsion de l'érythroblaste (Kawane et al., 2001), comme c'est le cas lors de la phagocytose des cellules apoptotiques. Enfin, la dégradation de l'ADN, qui suit l'énucléation, est dépendante de la voie de signalisation MEKK1-JNK (MEKK1, « MAP Kinase Kinase 1 »-JNK, « c-Jun-NH₂-terminal kinase ») (MAPK, « Mitogen-Activated Protein Kinase ») puisque les souris invalidées pour l'activité kinase de MEKK1 présentent un phénotype similaire à celui des souris DNase^{-/-} (Bonnesen et al., 2005).

I.B.5.4. La maturation du réticulocyte en érythrocyte.

Après énucléation, les réticulocytes nouvellement formés vont compléter leur maturation avant de passer dans la circulation sanguine. Sur une période de quelques jours, ils perdent progressivement la réticuline, leurs vacuoles, remodelent leur membrane et changent de forme. La perte des organelles et autres composants de la cellule s'effectue par deux processus : par fusion des vésicules avec la membrane plasmique et externalisation de leur contenu, ainsi que par exocytose du contenu des vacuoles. Le modèle de culture d'érythroblastes de souris infectés par le virus FVA a permis d'établir la chronologie des étapes de la maturation du réticulocyte (Koury et al., 2005). Une dégradation rapide des ribosomes et des ARN est observée, accompagnée par un déclin de la

synthèse de l'hème. Les caspases ne semblent donc jouer aucun rôle dans le remodelage qui accompagne la maturation terminale de l'érythrocyte (cf. chapitre II). Plus tardivement, les mitochondries sont éliminées par autophagie. Pendant cette période, le taux d'expression de Bcl-x_L décroît pendant que celui de Bax (« Bcl2-associated X protein ») reste stable ; la dégradation concomitante de la machinerie apoptotique empêche l'apoptose de se produire. Récemment, un autre rôle d'une protéine de la famille Bcl2 (« B-Cell Lymphoma 2 ») appelée Nix a été mis en évidence : une de ses propriétés serait de diriger les mitochondries vers l'autophagosome lors de la maturation des réticulocytes (Chen et al., 2008; Sandoval et al., 2008)(cf. chapitres II.A.3.1 et II.A.4.1.1.1.).

Au cours de sa maturation, le réticulocyte subit des remaniements importants de son cytosquelette avec une perte des récepteurs à la transferrine et la synthèse de la protéine 4.1R formant des complexes ternaires avec la Spectrine et l'Actine. Le réticulocyte perd sa forme irrégulière et rigide pour devenir une cellule discoïde biconcave de plus petite taille. Le squelette membranaire de l'érythrocyte est organisé en un réseau constitué de courts filaments d'Actine, associés à des molécules longues et flexibles de Spectrine. Cette organisation confère à la membrane sa force et sa souplesse nécessaires au maintien de son intégrité dans la circulation sanguine et les micro-vaisseaux. Des défauts de ces composants sont associés à diverses anémies hémolytiques. Des travaux récents ont montré que les GTPases Rac1 et Rac2 (GTP, Guanosine TriPhosphate), qui possèdent une fonction redondante, modulent la dynamique du cytosquelette de l'érythrocyte en maintenant sa flexibilité (Kalfa et al., 2006).

I.C. Description de l'érythropoïèse chez l'homme adulte au niveau transcriptionnel

Les expériences d'inactivation génique et de surexpression ont depuis longtemps montré le rôle essentiel des facteurs de transcription dans la différenciation hématopoïétique (Orkin, 2000). On observe, en pathologie maligne lymphoïde et myéloïde, de nombreux réarrangements chromosomiques impliquant ces facteurs de transcription qui voient leur fonction physiologique modifiée. La figure E1 les représente et précise leur(s) niveau(x) d'action identifiée(s) par les expériences d'inactivation génique chez la souris (d'après Orkin et Zon, 2008). On distingue deux principaux types de facteur de transcription en fonction de leur niveau d'action dans la hiérarchie hématopoïétique :

- Les facteurs de transcription intervenant dans la formation et le maintien des cellules hématopoïétiques : TAL-1/SCL, LmO2, ETV6/TEL, GATA-2, RUNX-1 et Gfi-1 (pour revue, cf. Orkin & Zon, 2008)

- Les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation vers un lignage hématopoïétique donné : par exemple GATA-1, Gfi-1B, EKLF (Erythroid Kruppel-like Factor) au cours de l'érythropoïèse ou SPI-1/PU-1, C/EBP α (« Ccaat-enhancer-binding proteins α ») au cours de la granulopoïèse neutrophile (Tableau E1).

Cette distinction est totalement arbitraire, certains facteurs transcriptionnels intervenant à différents niveaux de l'hématopoïèse : Gfi-1 et TAL-1 (« T-cell acute lymphocytic leukemia 1 »), par exemple, joue un rôle fondamental dans la quiescence des HSC mais également un rôle spécifique au cours des maturations granuleuses et érythroïdes, respectivement. De plus, les facteurs de transcription peuvent être impliqués dans différentes lignées hématopoïétiques : GATA-1 par exemple est indispensable à la maturation érythroïde terminale, mais joue aussi un rôle dans la lignée mégacaryocytaire, éosinophile et mastocytaire. Enfin, la différenciation d'un progéniteur multipotent dans une lignée donnée nécessite aussi bien l'expression de certains facteurs de transcriptions que la répression de facteurs impliqués dans d'autres lignées. Cet antagonisme a été bien décrit au cours de l'érythropoïèse : GATA-1 et SPI-1/PU.1 interagissent et s'antagonisent mutuellement pour promouvoir, à partir d'un progéniteur commun, la différenciation érythro-mégacaryocytaire et myéloïde respectivement (Galloway et al., 2005) (Rhodes et al., 2005a). De même, EKLF et Fli-1 (« Friend leukemia virus integration 1 ») ont un effet antagoniste au stade MEP pour promouvoir le lignage érythroïde (EKLF) ou mégacaryocytaire (Fli-1) (Starck et al., 2003).

Le mécanisme d'action des facteurs de transcription nécessite :

- La reconnaissance d'une séquence consensus, située sur les promoteurs cibles, par un domaine de liaison à l'ADN spécifique. Les facteurs de transcription ont en général un domaine de liaison à l'ADN distinct du domaine de transactivation. Tous les types de liaison connus sont retrouvés dans l'hématopoïèse : « zinc finger », bHLH (« basic-Helix-Loop-Helix »), domaine ets, leucine zipper, homéodomaine.

- Un domaine de transactivation qui permet le recrutement de co-régulateurs transcriptionnels. Ces co-régulateurs peuvent être activateurs, répresseurs ou les deux, selon le contexte cellulaire. Ils peuvent agir directement sur la transcription en recrutant la machinerie transcriptionnelle basale sur les promoteurs. Ils peuvent aussi participer à la régulation de la transcription en modifiant la configuration chromatinienne, la rendant ouverte et apte à la transcription ou au contraire fermée et transcriptionnellement inactive.

Facteurs de Transcription	Séquence ADN	Gènes Cibles	Phénotype lors invalidation gène	Pathologie humaine
GATA-1	5' A/T GATA A/G 3'	Globines, protéines de membrane spécifique de la lignée érythroïde, GATA-1, GATA-2	Anémie et thrombopénie	Anémie liée à l'X ou thrombopénie, Leucémie mégacaryoblastique associée au syndrome de Down
GATA-2	5' A/T GATA A/G 3'	GATA-1, GATA-2	Absence de prolifération des progéniteurs immatures	
TAL-1	5' CAGATG 3'	Glycophorine A, p21	Anémie, Absence de HSC	Leucémie aiguë lymphoblastique T
EKLF	5' CCNCACCC 3'	Globines	Anémie	
p45NF-E2	5' TGAC/GTCAGCA 3'	Enzymes impliquées dans la voie de synthèse de l'hème, globines	Thrombopénie	
ZBP-89	5' CCNCACCC 3'	Globines, gènes érythroïdes, GATA-1	Anémie et Thrombopénie	
Gfi-1b	5' TAAATC(A/T)GCA 3'	p21, SOCS1-3, Bcl _{XL}	Anémie	

Tableau E1 : Facteurs de transcriptions impliqués dans l'érythropoïèse

Les facteurs de transcriptions sont indiqués avec leur site d'interaction avec l'ADN et leurs gènes cibles, ainsi que le phénotype observé chez la souris lors d'expérience d'inactivation génique et dans des pathologies humaines où des mutations du gène sont impliquées.

I.C.1. Séquences en cis impliquées dans la régulation des gènes érythroïdes

L'analyse fonctionnelle des gènes érythroïdes et mégacaryocytaires a montré l'importance de la séquence, 5' A/T GATA A/G 3', appelé motif GATA, dans l'expression spécifique de ces gènes dans ces lignées (Orkin, 1992). Cette séquence GATA est associée à une séquence GT ou à une séquence CACC-like pour les gènes érythroïdes, alors qu'elle est associée à un site de fixation pour des facteurs Ets pour les gènes spécifiques de la différenciation mégacaryocytaire (Orkin, 1992). Ces associations de séquences sont considérées comme la « marque » spécifique des régions régulatrices des gènes érythroïdes ou mégacaryocytaires. Une autre séquence, 5' TGAC/GTCAGCA 3', se trouve dans la région des promoteurs ou des « enhancers » des gènes érythroïdes et est nécessaire à la transcription efficace des gènes qui contiennent ce motif (Raich and Romeo, 1993). Pour chaque motif récurrent identifié dans les régions régulatrices des gènes érythroïdes ou mégacaryocytaires, des familles de facteurs nucléaires, qui reconnaissent ces séquences, ont été caractérisées. L'expression des facteurs de transcription n'est pas restreinte à telle ou telle lignée hématopoïétique et leur activité spécifique, lors de l'érythropoïèse ou de la mégacaryopoïèse, résulte en fait de la spécificité de leur combinaison ou association.

I.C.2. Facteurs de transcriptions régulant l'expression des gènes érythroïdes

Ainsi, pendant la différenciation érythroïde, le profil d'expression de gènes érythroïdes suit une chronologie précise qui est principalement régulée au niveau transcriptionnel. Les études sur les facteurs *cis* et *trans* qui régulent les gènes érythroïdes, ainsi que la description des perturbations de l'érythropoïèse observées dans certaines leucémies ou maladies «érythroïdes » héréditaires et l'utilisation de modèles animaux expérimentaux, ont permis d'améliorer nos connaissances sur la régulation transcriptionnelle de l'érythropoïèse (cf. Cantor & Orkin, 2002 pour revue).

Les principaux facteurs de transcription impliqués dans l'érythropoïèse :

I.C.2.1. GATA-1 et GATA-2

L'engagement des progéniteurs multipotents vers la voie érythroïde semble s'effectuer grâce à une combinaison d'expression de facteurs de transcription et en particulier du facteur GATA-1. GATA-1 est absolument nécessaire au déroulement des phases tardives de l'érythropoïèse, en régulant la transcription des gènes de différenciation qui permettent l'acquisition du phénotype érythroïde comme la Gpa, l'hémoglobine, Epo-R, et l'expression de Bcl-x_L. En son absence, la production de globules rouges est impossible (Pevny et al., 1991) (Weiss et al., 1994).

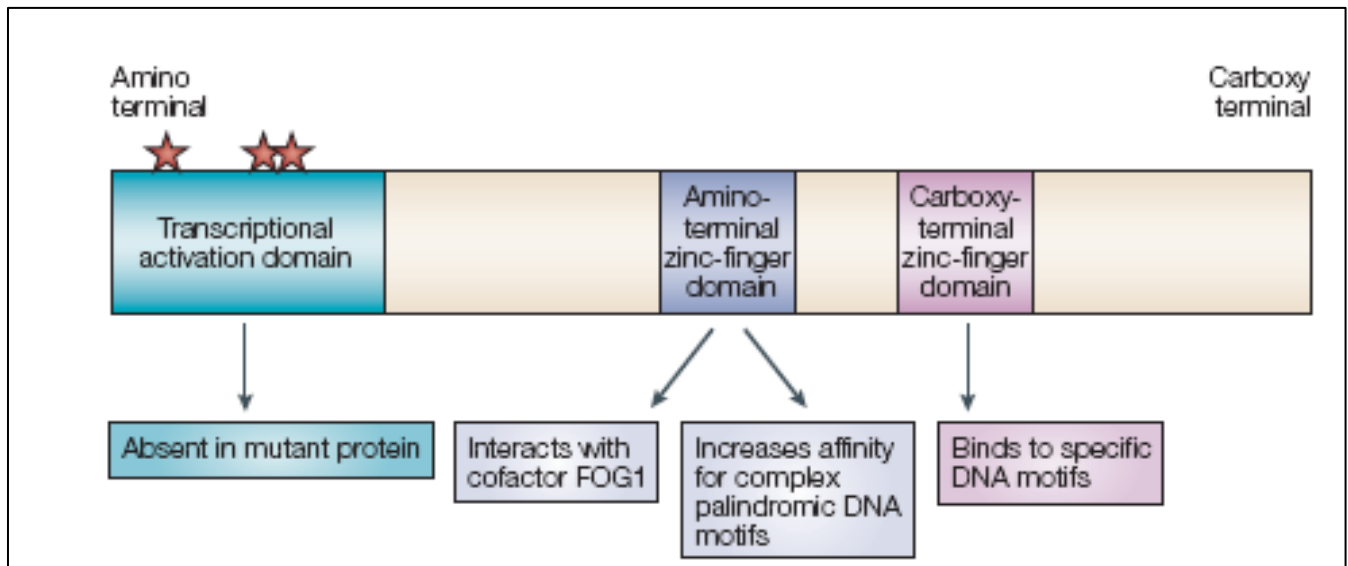


Figure E3 : Principaux domaines de GATA-1 et leur principale fonction

(tiré de Hitzler and Zipursky, 2005)

La famille des facteurs de transcriptions GATA comprend 6 membres, de GATA-1 à GATA-6, qui peuvent se fixer à la séquence consensus 5' A/T GATA A/G 3'. Ces protéines possèdent 2 motifs en « doigt de zinc » (Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys), spécifiques du domaine de liaison à l'ADN de la famille GATA, et un domaine N-terminal de transactivation recrutant les molécules de co-régulation nécessaire à leur fonction. La partie carboxy-terminale du motif en doigt de zinc est responsable de la fixation à l'ADN alors que sa partie amino-terminale stabilise l'interaction ADN/GATA (Trainor et al., 1996) . En dehors des régions en doigt de zinc, l'homologie entre les facteurs de transcription GATA est faible mais ils sont conservés entre les espèces. La figure E3 représente les principaux domaines de GATA-1 et leur principale fonction (Hitzler and Zipursky, 2005).

Les trois premiers membres de cette famille (GATA-1, 2, et 3) sont abondamment exprimés dans les tissus hématopoïétiques. Seuls GATA-1 et GATA-2 sont impliqués dans l'érythropoïèse (pour revue cf. Cantor & Orkin, 2002) et jouent un rôle à la fois dans la détermination des progéniteurs dans la voie érythroïde et la différenciation érythroïde terminale ((Ferreira et al., 2005) (Crispino, 2005) (Shimizu and Yamamoto, 2005) pour revue).

Au cours de l'érythropoïèse, l'expression de GATA-1 et GATA-2 est séquentielle. GATA-2 est précocement exprimée lors de la différenciation érythroïde, puis diminue de façon concomitante à l'augmentation de l'expression de GATA-1. De nombreuses études ont montré que GATA-2 est impliqué dans la prolifération cellulaire des progéniteurs multipotents ou érythroïdes, alors que GATA-1 est indispensable à la phase de maturation terminale des érythrocytes. Au niveau moléculaire, le relais entre GATA-1 et GATA-2 se produit au niveau transcriptionnel : GATA-2 inhibe la transcription du gène de GATA-1, et réciproquement. Cette régulation de GATA-1 et GATA-2 lors de l'érythropoïèse entraîne la substitution séquentielle de GATA-2 par GATA-1 sur les régions régulatrices de nombreux gènes de différenciation spécifiques de la lignée érythroïde (Leonard et al., 1993) (Mouthon et al., 1993) (Nagai et al., 1994) (Ohneda and Yamamoto, 2002). Le phénomène de « switch GATA » est une hypothèse séduisante pour expliquer l'engagement d'une cellule multipotente dans le lignage érythroïde. Une expression stochastique de GATA-1 au sein de certaines cellules immatures permet une répression de GATA-2, l'arrêt de la prolifération cellulaire et l'engagement des cellules dans la maturation érythroïde (pour revue, cf. (Bresnick et al., 2005)). Un tel mécanisme a été décrit lors de la différenciation érythroïde des cellules ES (cellules Souches Embryonnaires) murines (Lugus et al., 2007).

Le gène de GATA-1 est situé sur le chromosome X et est le membre fondateur de la famille des facteurs de transcriptions GATA. Au cours de l'hématopoïèse adulte, son expression est restreinte aux lignées érythroïde, mégacaryocytaire, éosinophile et mastocytaire. Les progéniteurs érythroïdes issus des cellules ES de souris GATA-1^{-/-} sont bloqués au stade proérythroblastique et ne participent pas *in vivo* à l'érythropoïèse définitive des souris chimères (Pevny et al., 1991) (Weiss et al., 1994). Les souris GATA-1^{-/-} meurent *in utero* par altération de l'érythropoïèse primitive et définitive. Les proérythroblastes ne peuvent pas se différencier en érythrocytes matures. La détermination des progéniteurs myéloïdes multipotents vers le lignage érythroïde est en revanche conservée : le nombre de progéniteurs BFU-E et CFU-E est normal chez ces souris (Fujiwara et al., 1996). Les souris transgéniques exprimant GATA-2 sous le contrôle du promoteur GATA-1 sont viables, ce qui prouve une certaine redondance de ces protéines dans l'hématopoïèse primitive. Cependant, cette redondance n'est que partielle dans l'érythropoïèse définitive, comme l'atteste l'anémie observée chez ces souris adultes (Takahashi et al., 2000).

Le rôle de GATA-1 dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation terminale des progéniteurs érythroïdes dépend à la fois du niveau et de la cinétique de son expression tout au long de l'érythropoïèse : une expression faible de GATA-1 dans les cellules souches embryonnaires (cellule ES) permet la prolifération des proérythroblastes, mais pas leur différenciation terminale (Pan et al., 2005). L'expression conditionnelle de GATA-1 dans les cellules ES GATA-1^{-/-} permet de restaurer *in vitro* l'érythropoïèse : la prolifération des érythroblastes est rétablie, mais seule une expression prolongée et tardive permet la restauration de leur différenciation terminale (Zheng et al., 2006).

Le rôle de GATA-1 n'est pas limité au lignage érythroïde : l'inactivation sélective de GATA-1 dans la lignée mégacaryocytaire induit une thrombopénie profonde, avec prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires et perte de leur différenciation terminale (Shivdasani et al., 1995) (Vyas et al., 1999a). GATA-1 agit à différentes étapes de la différenciation érythro-mégacaryocytaire. A chacune de ces étapes correspond un rôle spécifique dans le contrôle de la prolifération et/ou de la différenciation cellulaire, en fonction de son niveau d'expression et des partenaires protéiques auxquels il s'associe. Il a été récemment montré que GATA-1 intervenait d'abord précocement, au stade de progéniteur bipotent érythro-mégacaryocytaire puis plus tardivement au sein de complexes transcriptionnels spécifiques de la maturation terminale des proérythroblastes et des mégacaryocytes (Stachura et al., 2006).

L'implication de GATA-1 dans diverses pathologies humaines témoigne de son importance dans l'hématopoïèse. Des mutations somatiques du second exon de GATA-1 ont été décrites dans les syndromes myéloprolifératifs transitoires et dans les leucémies aiguës mégacaryoblastiques survenant chez les enfants porteurs de trisomie 21 (Wechsler et al., 2002). Ces mutations aboutissent à la synthèse d'un variant court, appelé GATA-1s (« short »), du domaine N-terminal de transactivation (Calligaris et al., 1995). Cette forme de GATA-1 est fonctionnelle, chez l'animal, puisque les souris transgéniques GATA-1s ont une érythropoïèse et une mégacaryopoïèse normales (Li et al., 2005). L'isoforme GATA-1s se lie normalement à l'ADN et interagit avec FOG-1 (« Friend Of GATA-1 »). Cependant, la perte du domaine N-terminal diminue sa capacité d'activation transcriptionnelle (Wechsler et al., 2002). Chez l'Homme, une mutation germinale de l'exon 2 a été décrite au sein d'une famille présentant une anémie macrocytaire constitutionnelle (Hollanda et al., 2006). Aucun cas de leucémie n'a été rapporté dans cette famille. Ainsi la transformation leucémique dans le syndrome de Down impliquerait, en plus de la perte de la forme longue de GATA-1, d'autres événements oncogéniques mal caractérisés à ce jour (Gurbuxani et al., 2004). La maladie hématologique observée au cours de la trisomie 21 se déroulerait en trois phases : un stade initial avec des anomalies de l'hématopoïèse, puis l'apparition de GATA-1s à l'origine d'un syndrome myéloprolifératif transitoire (10% des cas) et enfin la survenue d'un second événement génétique à l'origine d'une leucémie à mégacaryoblastes, particulière par l'expression de gènes érythroblastiques (Tunstall-Pedoe et al., 2008).

D'autres mutations germinales de GATA-1 ont été décrites dans quelques cas de thrombopénies constitutionnelles à grosses plaquettes et/ou de dysérythropoïèses liées à l'X (Nichols et al., 2000) (Freson et al., 2001) (Mehaffey et al., 2001). Ces mutations entraînent le plus souvent une diminution de la liaison de GATA-1 à son cofacteur FOG-1 ou plus rarement une diminution d'affinité de GATA-1 pour sa séquence palindromique sur l'ADN (Yu et al., 2002a).

L'activité de GATA-1 durant l'érythropoïèse est hautement régulée aux niveaux transcriptionnels, traductionnels et post-traductionnels. GATA-1 régule positivement la transcription de son gène en se fixant sur des sites GATA localisés dans les régions promoteurs et les « enhancers » du gène GATA-1 (Shimizu and Yamamoto, 2005). L'expression et l'activité de GATA-1 doivent être étroitement régulées pour prévenir l'accumulation de GATA-1 dans les cellules qui a comme effet de bloquer la différenciation érythroïde (Shimizu and Yamamoto, 2005). GATA-1 peut être acétylé, phosphorylé, et sumoylé et les conséquences de ces

modifications post-traductionnels commencent à être comprises. L'acétylation est une des voies importantes de régulation de l'activité de GATA-1. GATA-1 est acétylé sur des régions conservées, riches en lysine, près de l'extrémité C-terminale des domaines en doigt de zinc, par CBP (« cAMP Response Element-Binding (CREB) Binding Protein ») ou son paralogue P300 (Boyes et al., 1998). CBP est une histone acétyl-transférase (HAT) d'expression ubiquitaire, capable d'interagir avec de nombreux facteurs transcriptionnels et de participer à la régulation épigénétique par acétylation des histones et des protéines non histoniques (Bannister and Kouzarides, 1996) (Ogryzko et al., 1996) (Mayr and Montminy, 2001). CBP facilite l'activité transcriptionnelle de GATA-1 et induit la différenciation érythroïde dans la lignée érythroleucémique MEL (Blobel et al., 1998). Cette acétylation ne modifie pas la localisation nucléaire de GATA-1, ni sa localisation sur l'ADN, ni la stabilité de la protéine (Hung et al., 1999). Il a été suggéré que les résidus acétylés servent de point d'ancrage à de nouvelles molécules de co-régulation ou permettent de modifier la conformation de la protéine et l'accessibilité de la chromatine aux facteurs de transcription (Lamonica et al., 2006). Par ailleurs, l'acétylation de GATA-1 permet sa dégradation par le protéasome, après sa phosphorylation par la voie MAPKinase (Hernandez-Hernandez et al., 2006).

Il a été mis en évidence, dans un modèle de cellules MEL, que GATA-1 est phosphorylé sur 6 résidus sérines. Akt phosphoryle directement GATA-1 sur sa sérine 310 *in vitro* et *in vivo*, ce qui augmente son activité dans les cellules érythroïdes (Zhao et al., 2006). La phosphorylation de la Ser³¹⁰ de GATA-1 n'est pas indispensable pour l'expression de l'ensemble des gènes érythroïdes mais rend GATA-1 compétant pour l'activation de la transcription de gènes comme le gène TIMP-1 (« Tissue Inhibitor of MetalloProteinases-1 ») (Kadri et al., 2005). Enfin, l'activité de GATA-1 est dans certaines circonstances régulée par sa protéolyse par les caspases pendant la différenciation érythroïde terminale (cf. infra).

L'activité transcriptionnelle de GATA-1 est aussi dépendante d'interactions protéines-protéines. De nombreuses protéines ont été décrites comme interagissant physiquement avec GATA-1, incluant : CBP, LMO-2 (« LIM domain only 2 (rhombotome-like 1 »), TAL-1, Gfi-1b, PU-1, ZBP-89 (« Zinc finger Binding Protein of 89 kDa ») et plus particulièrement son cofacteurs FOG-1 (Tsang et al., 1997). FOG-1 est une protéine qui interagit avec la partie N-terminale de GATA-1 *via* 4 de ses 9 domaines en doigt de zinc (Fox et al., 1999). FOG-1 est co-exprimée avec GATA-1 dans les lignées érythroïde et mégacaryocytaire (Tsang et al., 1997) et les souris FOG-1^{-/-} possèdent un phénotype très proche de celui observé chez les souris GATA-1^{-/-} : mort *in utero*

par absence d'érythropoïèse définitive et blocage des précurseurs au stade proérythroblastique (Tsang et al., 1998). L'absence chez ces souris de mégacaryocytes témoigne en plus d'un rôle spécifique de FOG-1 dans la mégacaryopoïèse, en amont de celui de GATA-1. De nombreuses données ont relié les fonctions érythropoïétiques de GATA-1 à FOG-1 : l'interaction FOG-1/GATA-1 est essentielle au cours de la maturation érythroïde. Le remplacement d'un acide aminé dans la partie amino-terminale du motif en doigt de zinc de GATA-1, abolit son interaction avec FOG-1, ce qui a pour conséquence une anémie sévère létale pour les souris et une anémie avec dysérythropoïèse chez les patients. Les mécanismes moléculaires impliqués dans les interactions FOG-1/GATA-1 restent peu connus. Les études d'immunoprécipitation chromatinienne ont montré que GATA-1 n'occupait qu'une petite partie des séquences WGATA-R sur les régions cis-régulatrices des gènes cibles (Johnson et al., 2002) (Grass et al., 2003) (Pal et al., 2004) (Im et al., 2005) (Martowicz et al., 2005). FOG-1 facilite la liaison de GATA-1 à certains sites mais pas à d'autres (Letting et al., 2004) (Pal et al., 2004). Cette activité COF (« Chromatin Occupancy Facilitator ») représente un mécanisme primaire crucial de la régulation de la transcription des cibles de GATA-1 (pour revue, cf. (Kim and Bresnick, 2007)). La sélection des sites de liaison parmi les motifs WGATA-R pourrait répondre à un «code GATA» de reconnaissance dépendant du motif WGATA-R mais aussi des séquences environnantes et de la structure chromatinienne locale (Bresnick et al., 2005). Par exemple, la présence de GATA-1 sur le LCR (« Locus Control Region ») de la globine β permet de recruter FOG-1. Réciproquement, par son activité COF, FOG-1 facilite la liaison de GATA-1 sur le LCR. Ce complexe FOG-1/GATA-1 sur le LCR de la globine β modifie la conformation de la chromatine et facilite les interactions entre le LCR et le promoteur de la globine β majeur et donc active la transcription de ce gène (Vakoc et al., 2005) (Kim and Bresnick, 2007). Une des fonctions de FOG-1 est de permettre, en recrutant GATA-1 sur certains promoteurs érythroïdes, de faciliter le «switch» entre GATA-2 et GATA-1, caractéristique de la différenciation érythroïde terminale.

I.C.2.2. SCL/TAL-1 et son cofacteur LMO-2

SCL/TAL-1 est un membre de la famille des facteurs de transcription bHLH, qui initialement a été mis en évidence dans les réarrangements chromosomiques associés aux leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) (Begley et al., 1989a). TAL-1 joue un rôle essentiel au cours de l'hématopoïèse primitive et de la maturation des lignées érythrocytaire et mégacaryocytaire (Ravet et al., 2004) (Hall et al., 2003). Chez la souris et chez l'Homme, l'expression de TAL-1 est retrouvée dans les mégacaryocytes et les mastocytes et augmente progressivement au cours de la

différenciation érythroblastique (Mouthon et al., 1993). Les cellules ES *SCL*^{-/-} ne peuvent *in vitro* participer à la formation d'aucune colonie hématopoïétique (Porcher et al., 1996). L'invalidation de ce gène chez la souris est létale et les embryons meurent à 9,5 jours par absence d'hématopoïèse primitive (Robb et al., 1995).

Au niveau moléculaire, SCL/TAL-1 agit à la fois par des mécanismes dépendants et indépendants de son interaction avec l'ADN et peut activer ou réprimer la transcription. Le mécanisme d'action de SCL/TAL-1 implique à la fois des interactions protéiques spécifiques et une liaison à l'ADN des promoteurs cibles. SCL/TAL-1 forme des hétérodimères avec les protéines de la famille E (E2A en particulier) et se fixe sur les séquences consensus CANNTG présentes dans les régions cis-régulatrices des gènes cibles (Begley et al., 1989b).

L'hétérodimère E2A/SCL agit au cours de la différenciation érythroïde au sein d'un complexe pentamérique constitué des protéines à domaine LIM (Lmo2 et Ldb-1) et de GATA-1 (Wadman et al., 1997). Ce complexe est présent aux différents stades de l'érythropoïèse (Vyas et al., 1999b) (Xu et al., 2003) (Anguita et al., 2004) (Brand et al., 2004) (Lahlil et al., 2004). LM02 est indispensable au bon déroulement de la différenciation érythroïde, l'invalidation de ce gène aboutissant à un phénotype identique à celui des souris *SCL*^{-/-} (Warren et al., 1994). LM02 assure la liaison entre le complexe SCL/E2A sur la boîte E et GATA-1 (Warren et al., 1994) (Osada et al., 1995). La liaison de SCL à l'ADN n'est pas indispensable à toutes ses fonctions hématopoïétiques mais est nécessaire à la différenciation érythroïde terminale (Ravet et al., 2004) (Porcher et al., 1999) (Kassouf et al., 2008).

Les facteurs de transcriptions SCL/ TAL-1 et GATA-1 ont été décrits comme étant clivés par les caspases dans les érythroblastes. GATA-1 possède 3 sites de clivage par les caspases : deux sites mineurs et un site majeur qui est clivé par les caspase-3, -7, -8, -9 et -10 ce qui aboutit à des fragments de 30 kDa et 16 kDa (De Maria et al., 1999b). SCL/Tal-1 est également clivé par les caspase-3, -7 et -8 en deux fragments d'environ 24 et 20 kDa (Zeuner et al., 2003a). L'induction de l'apoptose érythroblastique par activation de la voie Fas a pour conséquence une diminution rapide du taux de SCL/ TAL-1, qui précède une accentuation de l'activation de la caspase-3, la dégradation de GATA-1 et l'augmentation du taux de GATA-2. L'augmentation du taux de GATA-2 après l'activation de la caspase-3 est possiblement le résultat de la réduction considérable de l'activité inhibitrice de GATA-1 (Zeuner et al., 2003a).

I.C.2.3. EKLF et SP1

Le motif CACCC associé au motif GATA dans les régions régulatrices des gènes érythroïdes est reconnu par les facteurs nucléaires de la famille SP1, et pour certains gènes, par le facteur érythroïde spécifique EKLF.

EKLF est un facteur de transcription en doigt de Zinc impliqué dans la synthèse de la globine β (Miller and Bieker, 1993). Des mutations de cette séquence chez l'homme sont retrouvées dans certaines β -thalassémies et chez la souris l'inhibition ciblée par mutagenèse dirigée du gène d'EKLF aboutit aussi à une β -thalassémie (Orkin et al., 1982) (Nuez et al., 1995) (Perkins et al., 1995) (Orkin et al., 1982). Des mutations « perte de fonction » du promoteur ou de la séquence codante du gène ont été récemment incriminées dans les groupes sanguins rares, caractérisés par une perte d'expression des antigènes Luteran à la surface des érythrocytes (Singleton et al., 2008). EKLF est impliqué dans l'activation et dans l'initiation de l'expression des gènes de la globine de sa forme fœtale à sa forme adulte (Donze et al., 1995) (Perkins et al., 1996) (Wijgerde et al., 1996) (Gillemans et al., 1998) (Zhou et al., 2006). EKLF est nécessaire aux dernières étapes de la différenciation érythroïde et régule divers gènes impliqués dans la biosynthèse de l'hème ou du cytosquelette (Drissen et al., 2005) (Hodge et al., 2006) (Nilson et al., 2006) (Pilon et al., 2006). EKLF active la transcription, par recrutement de molécules de co-régulation parmi lesquelles CBP (Zhang et al., 2001) et Brg-1 (Armstrong et al., 1998) (Tewari et al., 1998). Les sites de fixation EKLF sont à proximité des sites GATA-1 sur les régions cis-régulatrices des gènes cibles, évoquant une interaction directe entre ces deux facteurs de transcription dans la régulation de ces gènes érythroïdes (Merika and Orkin, 1995). Le complexe protéique incluant EKLF, FOG-1 et GATA-1 permet en effet de maintenir le promoteur de la globine β en conformation chromatinienne ouverte (Drissen et al., 2004).

Par son domaine de liaison à l'ADN, EKLF bloque *in vitro* l'activation transcriptionnelle induite par Fli-1, de gènes mégacaryocytaires tels que GPIX (Glycoprotéine IX) (Starck et al., 2003).

EKLF est réprimé au cours de la différenciation mégacaryocytaire (Frontelo et al., 2007) (Bouilloux et al., 2008). Fli-1 bloque l'activation des gènes érythroïdes cibles de EKLF ; il est possible que l'action antagoniste d'EKLF et Fli-1 soit un déterminant essentiel de l'engagement du progéniteur bipotent érythro-mégacaryocytaire vers l'un ou l'autre de ces lignages (Starck et al., 2003).

SP1 est un facteur de transcription appartenant, tout comme EKLF, à la famille SP/KLF (pour revue cf. (Philipsen and Suske, 1999)). Contrairement à EKLF, son expression est ubiquitaire.

Les souris SP1^{-/-} meurent précocement à 9,5 jours de vie intra-utérine, mais les chaînes de globine restent exprimées (Marin et al., 1997), peut-être du fait de la redondance entre SP1 et d'autres membres de la famille SP : les souris SP1⁻/SP3⁻ présentent en effet une anémie marquée avec diminution du nombre de progéniteurs érythroïdes (Kruger et al., 2007). Sur les régions promotrices des gènes érythroïdes, les sites consensus de liaison de SP1 sont au voisinage des sites GATA-1. Des interactions directes entre le domaine C-terminal de GATA-1 et le domaine en doigt de zinc de SP1 ont été mises en évidence et augmentent de façon synergique l'activité transcriptionnelle de GATA-1 (Merika and Orkin, 1995) (Gregory et al., 1996).

I.C.2.3. NF-E2

NF-E2 (« Nuclear Factor-Erythroid derived 2 ») est un facteur transcriptionnel, de type leucine-zipper, exprimé dans les cellules érythroïdes et mégacaryocytaires. Il est constitué d'une sous-unité spécifiquement hématopoïétique (p45/NFE-2) qui s'hétérodimérise avec p18/NFE-2, protéine de la famille Maf (« musculoaponevrotic fibrosarcoma oncogene homolog ») ubiquitairement exprimée (Andrews et al., 1993). p45 contient le domaine de transactivation, p18 (ou MafK) ne contient pas de domaine de transcription, mais peut se fixer à l'ADN en reconnaissant les séquences consensus TGCTGA(G/C)TCA sur les régions cis-régulatrices de nombreux gènes spécifiques de la différenciation érythroïde, incluant les LCRs des gènes de la α et β -globine. Dans le système hématopoïétique, p45 est exprimé dans la lignée érythroïde, mégacaryocytaire et dans les mastocytes (Andrews et al., 1993). Dans la lignée érythroïde, NF-E2 joue un rôle essentiel dans la synthèse des gènes de globine. Une des fonctions de NF-E2 est de recruter la RNA polymérase II (Pol II) sur le promoteur du gène de la globine β (Johnson et al., 2001). La régulation de l'activité transcriptionnelle de NF-E2 lors de l'érythropoïèse est unique, les niveaux des protéines p18 et p45 ne changent pas lors de la différenciation érythroïde, alors que la fixation à l'ADN de NF-E2 et son activité transcriptionnelle augmentent au cours de la différenciation. Ceci survient lors de la relocalisation de p18 des compartiments d'hétérochromatine dans les progéniteurs érythroïdes aux compartiments d'euchromatine où p45 est localisé dans les cellules érythroïdes exprimant les gènes cibles de NFE-2 (Shivdasani et al., 1995).

Des interactions directes entre le domaine N-terminal de p45 et CBP ont été observées *in vitro*. CBP acétyle p18/NF-E2 et augmente son affinité pour l'ADN (Hung et al., 2001) ; il acétyle également les histones : le niveau d'acétylation des histones est abaissé sur le promoteur de la globine dans les cellules CB3 qui n'expriment pas p45/NF-E2 (Johnson et al., 2001). Ainsi, le

recrutement de CBP par p45/NF-E2 sur le promoteur de la globine permet une modulation de son activité transcriptionnelle par régulation positive de la structure chromatinienne.

I.C.2.4. c-Myb

c-Myb (« myeloblastosis viral oncogene homolog ») est constitué de 3 domaines fonctionnels : un domaine de liaison à l'ADN à l'extrémité N-terminale, un domaine central de transactivation et un domaine régulateur C-terminal (Oh and Reddy, 1999). c-Myb est fortement exprimé dans les progéniteurs hématopoïétiques multipotents (Oh and Reddy, 1999). Dans l'érythropoïèse, son expression est maximale dans les CFU-E et dans les proérythroblastes puis décline dans les cellules plus différenciées (Emilia et al., 1986). c-Myb semble jouer un rôle déterminant au cours des phases précoces, prolifératives de l'érythropoïèse. Dans les cellules érythroïdes primaires, l'expression de c-Myb est maximale dans les BFU-E en phase proliférative et décroît lors de l'induction de la différenciation terminale par l'Epo (Bartunek et al., 2003) (Kolbus et al., 2003). La répression de l'expression de c-Myb par GATA-1 serait un élément de la bascule entre phase précoce de prolifération et phase tardive de différenciation terminale. c-Myb pourrait d'ailleurs jouer un rôle clé dans l'engagement du progéniteur MEP vers le lignage érythroïde au détriment de la mégacaryopoïèse : une expression anormalement faible de ce facteur de transcription induit chez la souris une thrombocytose marquée et une augmentation du nombre de progéniteurs mégacaryocytaires (Sandberg et al., 2005). L'expression de c-Myb est régulée négativement par le microRNA (miRNA) mR150 ; l'induction de ce miRNA par la Tpo serait à l'origine de la diminution de c-Myb dans un progéniteur bipotent, favorisant son engagement dans le lignage mégacaryocytaire (Barroga et al., 2008).

I.C.2.4. Gfi-1B

Gfi-1B est un membre de la famille des facteurs de transcription Gfi-1. Chez la Souris, l'expression de Gfi-1B est retrouvée dans les tissus hématopoïétiques et dans les testicules (Tong et al., 1998). Les souris *gfi-1B*^{-/-} meurent *in utero* d'anémie profonde, et présentent aussi une thrombopénie majeure. Chez l'Homme, les cellules CD34⁺ médullaires, les cellules érythroïdes Gpa⁺ et les précurseurs mégacaryocytaires CD41⁺ expriment Gfi-1B (Osawa et al., 2002). L'expression de Gfi-1B augmente parallèlement à celle de GATA-1, lors de la différenciation érythroïde *in vitro* de cellules CD34⁺ humaines purifiées à partir de moelle osseuse (Osawa et al., 2002). Gfi-1B réprime l'expression de p21, SOCS1 et SOCS3 (« Suppressor Of Cytokine Signaling ») et de son propre gène. Gfi-1B serait impliqué comme répresseur transcriptionnel nécessaire aux phases tardives de la différenciation érythroïde terminale (Garçon et al, 2005). La

surexpression de Gfi-1B *via* son association avec GATA-1 a un effet inhibiteur de la transcription de Bcl-x_L. En effet, la décroissance de Gfi-1B lors de la différenciation érythroïde terminale est nécessaire à l'induction de la synthèse de Bcl-x_L (Kuo and Chang, 2007).

I.C.2.5. ZBP-89 et Id2

Le facteur de transcription à doigt de zinc ZBP-89 est un des composants du complexe multiprotéique comportant GATA-1 et son cofacteur FOG-1. GATA-1 et ZBP-89 co-occupent des régions régulatrices en cis de certains gènes érythroïdes dont un domaine « enhancer » du gène GATA-1. Les études de perte de fonction de ZBP-89 chez le zebrafish et la souris ont montré que ZBP-89 est nécessaire au cours de l'érythropoïèse tardive et non au cours de l'érythropoïèse primitive. Ces aspects sont comparables à ceux observés chez les animaux où FOG-1 ou GATA-1 sont invalidés. Ainsi, ces données ont permis de mettre en évidence que ZBP-89 est un nouveau facteur de transcription impliqué dans la différenciation érythroïde et suggèrent qu'il joue une fonction en coopération avec GATA-1 et FOG-1 (Woo et al., 2008).

Les membres de la famille des Id (« Inhibitors of DNA binding ») sont des éléments clefs de la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Les protéines Id ont une activité de régulation « dominant-négative » des autres facteurs de transcriptions en les rendant incapables de se fixer à l'ADN et de réguler la transcription. La protéine Id2 possède une activité régulatrice négative du facteur de transcription E2A au cours de la lymphopoïèse B. Id2 intervient également dans la régulation de la différenciation érythroïde en interagissant avec différentes protéines cibles (Ji et al., 2008). La surexpression d'Id2 favorise l'érythropoïèse, alors qu'à l'inverse la diminution de son expression l'altère. L'effet d'Id2 sur l'érythropoïèse est induit *via* son interaction avec PU.1, en inhibant son effet et en accentuant l'activité transcriptionnelle de GATA-1.

I.D Régulation de l'érythropoïèse

Le processus de production des érythrocytes est orchestré par une association complexe de facteurs de transcription, parmi lesquels GATA-1 joue un rôle critique en régulant les gènes impliqués non seulement dans la différenciation érythroïde, mais aussi dans le cycle cellulaire et la survie. Ce programme de différenciation doit être sous le contrôle d'une régulation positive et négative pour assurer une production continue, mais équilibrée, d'érythrocytes, suffisante pour assurer l'oxygénation des tissus périphériques.

I.D.1. Régulation positive de l'érythropoïèse

I.D.1.1. Régulation positive de l'érythropoïèse au niveau cellulaire

I.D.1.1.1. Régulation hormonale de l'érythropoïèse en dehors de l'érythropoïétine

La production constante de globules rouges nécessite différents composants incluant : le fer indispensable à la synthèse de l'hème et donc de l'hémoglobine, l'acide folique et la vitamine B12 pour la synthèse de l'ADN ou encore la vitamine B6 (cofacteur de l'ALAS2 (Delta-AminoLevulinate Synthase 2), enzyme impliquée dans la synthèse de l'hème) (pour revue, cf. Koury et Ponka, 2004). L'IGF-1 (« Insulin-like Growth Factor-1 ») et l'insuline stimulent la formation de BFU-E et de CFU-E humaines et murines (Kurtz et al., 1982) (Akahane et al., 1987b) (Sawada et al., 1989) (Correa and Axelrad, 1991) (Ratajczak et al., 1998). Le récepteur IGF-1-R est exprimé à la surface des progéniteurs érythroïdes (Ratajczak et al., 1998). IGF-1 (comme l'insuline) agit de façon synergique avec d'autres facteurs de croissance comme le SCF sur la prolifération et la survie des érythroblastes (Muta and Krantz, 1993), ou l'Epo lors de la différenciation érythroïde terminale (Muta et al., 1994).

Les hormones stéroïdes pourraient aussi augmenter la production de globules rouges mais aucune de ces molécules n'est impliquée dans la régulation fine de l'érythropoïèse. Cependant, cet effet des androgènes pourrait expliquer un taux d'hématocrite physiologiquement plus élevé chez les hommes que les femmes (Hero et al., 2005). Les mécanismes moléculaires sous-jacents sont mal connus. Les androgènes, augmentent le nombre de CFU-E chez la souris et le rat (Malgor et al., 1998) (Saitoh et al., 1999). Les mégacaryocytes humains expriment le récepteur aux androgènes (Claustres and Sultan, 1988) (Khetawat et al., 2000). Une telle expression reste encore débattue dans les érythroblastes (Claustres and Sultan, 1988) (Leberbauer et al., 2005), mais les androgènes stimulent *in vitro* la prolifération de progéniteurs érythroïdes issus de sang de cordon de nouveau-nés de sexe féminin (Leberbauer et al., 2005).

De façon similaire, les glucocorticoïdes pourraient participer à l'augmentation de la production érythroïde au cours de l'érythropoïèse de stress (Bauer et al., 1999). Les glucocorticoïdes se fixent sur leur récepteur nucléaire (GR, « Glucocorticoid Receptor ») et modulent l'expression de gènes dont les régions cis-régulatrices contiennent des « éléments de réponse » spécifiques (Beato et al., 1995). Les glucocorticoïdes favorisent la prolifération de progéniteurs érythroblastiques immatures et retardent l'induction de leur différenciation terminale (Wessely et al., 1997) (von Lindern et al., 1999) (Leberbauer et al., 2005). Ils coopèrent avec Epo-R et c-kit pour induire la prolifération des érythroblastes *in vitro* (von Lindern et al., 1999) (Reichardt et al.,

1998) (Wessely et al., 1997). L'expression de gènes impliqués dans la prolifération érythroblastique tels que *c-Myb*, *c-kit* ou encore *LMO2* est induite en présence de Dexaméthasone (von Lindern et al., 1999). Les glucocorticoïdes participent à la réponse érythroïde au stress hypoxique (Bauer et al., 1999) qui résulte d'un équilibre entre signaux de prolifération régulés par les glucocorticoïdes et signaux de différenciation dépendants au moins en partie de p53 qui s'oppose à l'action des corticoïdes (Ganguli et al., 2002).

L'hypothyroïdie est fréquemment responsable en clinique d'une anémie macrocytaire non régénérative et le traitement hormonal substitutif en permet la correction (Horton et al., 1976). Les souris knock-out n'exprimant pas le récepteur aux hormones thyroïdiennes ne présentent pas d'anomalie notable de l'érythropoïèse (Forrest et al., 1996) (Fraichard et al., 1997) (Wikstrom et al., 1998). Cependant, dans des modèles d'érythropoïèse aviaire, en fonction de la fixation de son ligand (triiodothyronine ou T3), le récepteur aux hormones thyroïdiennes participe au «switch» entre prolifération cellulaire et différenciation terminale en recrutant des molécules de co-activation ou de co-répression permettant soit de maintenir une chromatine compacte, et fermée (sans T3), soit ouverte et transcriptionnellement active (en présence de T3) (Bauer et al., 1998). Une fonction similaire chez les mammifères n'a pas été décrite à ce jour.

Il a également été mis en évidence que le système rénine angiotensine jouerait un rôle dans la régulation de l'érythropoïèse. L'Angiotensine II stimule la prolifération des progéniteurs érythroïdes et un défaut d'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) peut être une cause d'anémie. L'utilisation des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC) dans le traitement de l'hypertension artérielle a induit l'apparition d'anémie chez certains patients (Vasku et al., 1998). A l'inverse, les situations cliniques où le système rénine angiotensine est activé s'accompagnent d'érythrocytose: sténose des artères rénales (Hudgson et al., 1967; Stephen and Lindop, 1998), tumeurs productrices de rénine (Stephen and Lindop, 1998), érythrocytose post-transplantation rénale réversible par les IEC et le Losartan (antagoniste des récepteurs à l'angiotensine de type 1) (Rell et al., 1994) (Conlon et al., 1996) (Mrug et al., 2004). Les souris ACE^{-/-} n'exprimant pas l'enzyme de conversion de l'angiotensine sont anémiques. Cette anémie est corrigée par l'administration exogène d'angiotensine II (Cole et al., 2000). Deux mécanismes distincts ont été décrits: 1/ l'activation directe des récepteurs à l'angiotensine II de type 1 (AT-1) à la surface des précurseurs érythroïdes: le nombre de BFU-E est augmenté après activation du récepteur AT-1 (Mrug et al., 1997). Cet effet clonogénique est inhibé par le Losartan. 2/ l'augmentation de la production rénale d'Epo (Nakao et al., 1967) (Gould et al., 1973)

(Freudenthaler et al., 1999). Ce mécanisme est prédominant *in vivo*, la perte d'expression du récepteur AT-1 dans les précurseurs médullaires ne corrigeant pas l'érythrocytose survenant après activation du système rénine angiotensine (Kato et al., 2005).

I.D.1.1.2. Régulation de l'érythropoïèse par les facteurs de croissance

Ces cytokines jouent un rôle crucial dans la régulation positive de l'érythropoïèse. Elles sont principalement produites par les cellules du stroma médullaire : fibroblastes, adipocytes, cellules endothéliales mais aussi cellules hématopoïétiques, notamment les monocytes et les macrophages de l'îlot érythroblastique, ou encore les lymphocytes, ou dans d'autres organes que la moelle osseuse particulièrement le foie et les reins pour la Tpo et l'Epo, respectivement.

Elles peuvent exercer un contrôle positif sur l'érythropoïèse, en activant des signaux de prolifération ou de survie. Elles agissent sur les progéniteurs et les précurseurs à tous les stades de différenciation (BFU-E, CFU-E, précurseurs érythroïdes) pour prévenir l'apoptose, induire la prolifération ou retarder/inhiber la différenciation (comme le SCF, par exemple). Elles peuvent au contraire activer la maturation érythroïde terminale au détriment de l'amplification des progéniteurs et exercer ainsi un rétrocontrôle négatif sur l'érythropoïèse (comme le TGF- β , « Transforming Growth Factor β », par exemple).

Plusieurs cytokines ont été décrites comme ayant un effet important pour promouvoir l'activité des progéniteurs érythroïdes (augmentant le nombre de BFU-E) incluant : la Tpo, IL-3, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, GM-CSF (« Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor ») (Birkmann et al., 1997)). Cependant, aucune d'entre elles n'est cruciale pour le développement érythroïde *in vivo*. Les expériences d'invalidation génique chez la souris ont montré que, contrairement à l'Epo et le SCF, qui agissent sur leurs récepteurs cellulaires respectifs c-kit et l'Epo-R, aucun de ces facteurs de croissance n'était indispensable à la maturation érythroïde *in vivo*.

Dans ce chapitre nous allons nous focaliser sur les mécanismes d'actions au niveau cellulaire et moléculaire du SCF et de l'Epo.

I.D.1.1.2.1. Stem cell factor et c-kit

Le SCF, produit par les cellules du micro-environnement médullaire, active à la surface des progéniteurs érythroïdes son récepteur c-kit (Broudy, 1997). Le récepteur c-kit est exprimé à la surface des progéniteurs hématopoïétiques depuis les cellules multipotentes CD34⁺ jusqu'aux progéniteurs érythroïdes CFU-E. Au cours de l'érythropoïèse tardive, l'expression de c-kit diminue progressivement et disparaît au stade érythroblaste polychromatophile et acidophile. Les souris *SCF*^{-/-} ou *c-kit*^{-/-} présentent des anomalies de pigmentation cutanée, une stérilité et une

atteinte hématopoïétique touchant principalement le compartiment des progéniteurs multipotents, la lignée mastocytaire et l'érythropoïèse (Chabot et al., 1988) (Geissler et al., 1988).

Le SCF est présent sous deux isoformes, produits d'un épissage alternatif de l'ARNm (Acide RiboNucléique messenger) : une forme soluble biologiquement active et une forme membranaire qui a perdu un site de protéolyse permettant le clivage de la protéine (Anderson et al., 1990 Martin et al., 1990; Flanagan et al., 1991). Cette forme, liée à la membrane, est biologiquement active (Majumdar et al., 1994). Elle est indispensable au bon déroulement de l'érythropoïèse *in vivo*: les souris qui n'expriment que la forme soluble de SCF présentent une anémie macrocytaire sévère (Flanagan et al., 1991) (Kapur et al., 1999). La présentation membranaire du SCF permet une activation prolongée et optimale de c-kit dans les cellules érythroïdes, alors que la forme soluble induit une internalisation et une dégradation plus rapide du récepteur.

Au niveau cellulaire, l'activation de c-kit prédomine au cours de l'érythropoïèse précoce : le SCF est essentiel à la prolifération, à la survie et à la différenciation des BFU-E immatures en CFU-E et les proérythroblastes (Geissler et al., 1988). Parallèlement et à l'inverse, il retarde la maturation érythroïde terminale des proérythroblastes (Muta et al., 1995). Le SCF permet donc l'amplification d'un compartiment de progéniteurs immatures ; son action est, dans la hiérarchie de différenciation érythroïde, plus précoce que celle de l'Epo qui prédomine au stade CFU-E. Cet effet permet un auto-renouvellement des progéniteurs et précurseurs érythroïdes avant qu'ils n'aient atteint le stade de différenciation ne pouvant plus entrer en division. Aux stades plus tardifs de maturation, son rôle principal est d'empêcher l'apoptose et d'induire la prolifération en synergie avec l'Epo.

Il n'y a aucune preuve actuellement que la production de SCF par la moelle osseuse serait régulée par les besoins en globules rouges et en oxygénation. Sa synthèse est probablement plus constitutive et bien que cela ne soit pas prouvé, le taux de SCF disponible pourrait dépendre de sa fixation/consommation par le taux protéine c-kit exprimé sur les précurseurs érythroïdes.

En conclusion, il est maintenant bien admis que la régulation de l'érythropoïèse à partir du stade CFU-E dépend essentiellement du taux d'Epo disponible.

I.D.1.1.2.2. L'érythropoïétine et son récepteur

L'hémoglobine des érythrocytes transporte l'oxygène des poumons et le délivre aux autres tissus. Le nombre d'érythrocytes circulants est le déterminant principal de l'oxygénation tissulaire. Bien que la production quotidienne d'érythrocytes soit finement régulée, la perte de sang secondaire à un saignement ou à une hémolyse entraîne une augmentation de la production de réticulocytes, en

quelques jours. Alors que l'augmentation du taux de réticulocytes corrige le nombre d'érythrocytes circulants, le taux de formation de réticulocytes diminue afin d'éviter d'avoir une polyglobulie en rebond. L'Epo est responsable de ce contrôle homéostatique harmonieux du nombre d'érythrocytes par l'oxygénation tissulaire. Ainsi, une relation inverse est reconnue entre l'érythropoïèse et l'oxygène délivré par le sang (Figure E4). Les variations de concentration sérique de l'Epo sont relativement faibles (5-30 mU/ml) et en conditions physiologiques, une diminution linéaire de l'hématocrite a pour effet une augmentation exponentielle du taux sérique d'Epo.

C'est à la fin du XIXème siècle que les médecins établissent le lien entre oxygénation et taux d'hématocrite (Bert, 1882 ; Viault, 1890). Carnot et Deflandre évoquent dès 1906 l'existence d'un facteur humoral de régulation de l'érythropoïèse qu'ils nomment «hémopoïétine», en observant que la perfusion de sérum d'un lapin anémique augmente la réticulocytose d'un animal receveur. Ces expériences sont confirmées trente ans plus tard en 1953 chez le Rat (Erslev, 1953). L'Epo sera isolée 71 ans après sa première description dans les urines d'un patient souffrant d'aplasie médullaire (Miyake et al., 1977) et son gène, cloné en 1986 (Law et al., 1986).

Le rein est le site principal de production d'Epo pour l'érythropoïèse définitive. L'ablation du rein entraîne une perte de la réponse érythropoïétique à l'hypoxie (Schooley and Mahlmann, 1972) (Koury et al., 1989b). La majorité de l'Epo circulante est en effet produite par le rein, essentiellement par les fibroblastes de la corticale et de la médullaire externe. A l'état basal, l'Epo est produite par les fibroblastes de la jonction cortico-médullaire ; en condition hypoxique, les fibroblastes producteurs sont progressivement recrutés à la fois dans la corticale et dans la médullaire (Koury et al., 1989b) (Maxwell et al., 1993). Ainsi, le nombre de ces cellules produisant de l'Epo augmente de façon exponentielle avec la diminution linéaire de l'hématocrite. Le taux d'hémoglobine ne régule pas la production rénale d'Epo : les hémoglobines hyperaffines ou les déficits familiaux en 2,3 DPG (2,3 DiPhosphoGlycerate) se caractérisent par une diminution de la libération de l'oxygène aux tissus, donc à une hypoxie locale qui est à l'origine d'une polyglobulie secondaire liée à la sécrétion permanente d'Epo.

Une partie minoritaire de la production d'Epo est hépatique : elle a lieu dans les cellules stellaires et les hépatocytes (Koury et al., 1991) (Maxwell et al., 1994). Alors que le foie est la principale source de production d'Epo durant la vie fœtale, son rôle dans le contrôle de l'érythropoïèse est plus limité : la production est faible à l'état basal, augmente en cas d'hypoxie, mais reste néanmoins insuffisante pour assurer une érythropoïèse normale, comme le montre l'anémie

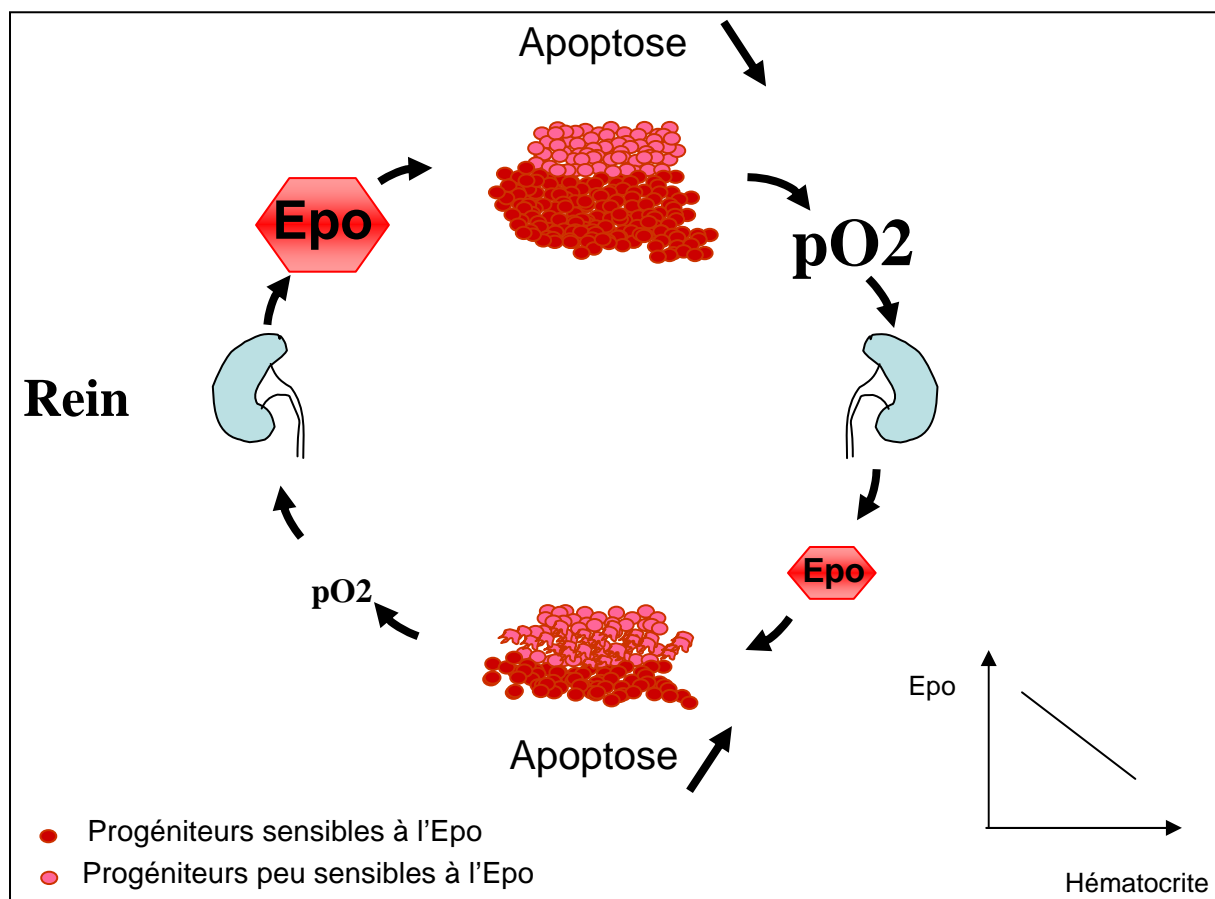


Figure E4 : Régulation endocrine de l'érythropoïèse

invariablement observée chez les patients atteints d'insuffisance rénale sévère (Caro et al., 1979). Le nombre de cellules hépatiques productrices d'Epo augmente aussi de façon très importante quand le taux d'hématocrite diminue (Yoshida et al., 2005).

Une production d'Epo a été également décrite dans d'autres organes : les testicules, le cerveau, la rétine, et le placenta. Cette production minoritaire est également sensible à l'hypoxie (Tan et al., 1991).

L'expression du gène *Epo* est sous la dépendance d'un site « enhancer » situé à son extrémité 3' peu après le signal de polyadénylation. Sur cet « enhancer » se fixe le complexe transcriptionnel HIF (« Hypoxia Inducible Factor ») qui régule positivement l'expression du gène *Epo* (Semenza et al., 1991) (Wang et al., 1995). Cette activité « enhancer » est également régulée positivement par le chélateur du fer Desferoxamine, le cobalt, le manganèse ou encore le nickel. Le facteur HIF a été cloné en 1995 (Wang et al., 1995). Il est constitué de deux sous unités : HIF- α (dont il existe 3 isoformes : HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α) et HIF- β qui s'hétérodimérisent. La sous-unité β est exprimée de façon constitutive. La régulation de l'activité « enhancer » est donc dépendante de la quantité de chaînes α disponibles. Celle-ci est régulée par les conditions d'oxygénation locale. De façon générale, la dégradation de la chaîne α est sous la dépendance de plusieurs HIF-hydroxylases dont l'activité catalytique nécessite la présence d'oxygène et de fer (ce qui permet d'expliquer pourquoi les traitements chélateurs améliorent parfois l'érythropoïèse chez les patients souffrant d'hémosidérose) (Schofield and Ratcliffe, 2004).

Les deux mécanismes principaux de régulation de l'activité transcriptionnelle HIF sont :

- Le rôle de la protéine VHL (Von Hippel Lindau) : En normoxie, l'hydroxylation de la sous-unité α sur deux résidus Proline (P402 et P 564) donne un signal d'ubiquitinylation *via* la protéine VHL (Maxwell et al., 1999) (Ivan et al., 2001). HIF est alors dégradé par le protéasome et la synthèse d'Epo est réprimée. En situation d'hypoxie, l'activité proline-hydroxylase est inhibée, protégeant la sous-unité HIF- α de la dégradation par le protéasome (Gordan and Simon, 2007). Plusieurs mutations des gènes impliqués dans ce système de régulation ont été identifiées au cours de polyglobulies familiales (Lee et al., 2006a). Des mutations avec perte de fonction du gène *VHL* sont à l'origine de polyglobulies constitutionnelles décrites dans une région Russe proche de la Volga : en Chuvashie (Ang et al., 2002). Des polyglobulies constitutionnelles liées à une mutation d'une proline-hydroxylase PHD2 ont également été décrites (Percy et al., 2006). Une mutation avec gain de fonction du gène *HIF-2*, rendant la protéine stable et résistante à l'action des proline-hydroxylases, vient d'être décrite dans un cas de polyglobulie familiale (Percy

et al., 2008). Enfin, l'inactivation de *VHL*, au cours des carcinomes rénaux à cellules claires, est responsable de la polyglobulie observée dans ces tumeurs (Rathmell and Chen, 2008).

- Le recrutement du co-activateur transcriptionnel p300 : l'état d'oxygénation locale régule l'activité transcriptionnelle du complexe HIF par un deuxième mécanisme impliquant le recrutement de p300 (Arany et al., 1996). Ce recrutement est inhibé par l'hydroxylation de résidu asparagine situé sur le domaine C-terminal de HIF- α . Ainsi, en situation de normoxie, l'hydroxylation de HIF- α bloque le recrutement de p300 sur le promoteur du gène *Epo* et inhibe sa transcription (Lando et al., 2002).

Ce système de régulation *via* les HIF-hydroxylases oxygène-dépendantes n'est pas spécifique du gène *Epo* : des sites de liaison HIF sont présents sur les régions régulatrices de nombreux gènes régulés par l'hypoxie, tels que *VEGF* (« Vasular Endothelial Growth Factor ») ou encore les gènes codant pour les enzymes de la glycolyse (Ebert et al., 1995) (Firth et al., 1995) (Gleadle et al., 1995). La possibilité de moduler l'activité HIF constitue une cible thérapeutique potentielle dans certaines tumeurs, l'inhibition de l'activité HIF permettant de réduire l'angiogenèse locale et d'inhiber la croissance tumorale (Semenza, 2003).

L'Epo régule l'érythropoïèse selon un mode endocrine. Elle agit sur ses cellules cibles en activant son récepteur spécifique (Epo-R) présent à leur surface. Des études récentes ont montré que l'Epo-R jouait non seulement un rôle dans l'érythropoïèse, mais surtout participait à une fonction globale de protection des tissus vis à vis de l'hypoxie. D'une part, au niveau de l'organisme entier, la production rénale d'Epo et la stimulation endocrine de son récepteur à la surface des érythroblastes permettent d'adapter en permanence la production d'érythrocytes aux besoins en oxygène des tissus, d'autre part, l'Epo agit au niveau des différents tissus par stimulation paracrine ou autocrine de son récepteur, en réponse à un stress hypoxique local.

I.D.1.1.2.2.1. Expression du récepteur à l'érythropoïétine en dehors de l'hématopoïèse

De nombreuses études ont montré que la fonction du système Epo/Epo-R ne se limitait pas à l'érythropoïèse. Les souris *Epo-R^{-/-}*, exceptée l'absence de maturation érythroïde terminale, présentent des malformations cardiaques et des anomalies sévères du développement cérébral (Wu et al., 1999b) (Yu et al., 2002b). Chez l'adulte, le récepteur Epo-R est exprimé et fonctionnel dans de nombreux tissus tels que le rein, l'intestin, le tissu mammaire, le placenta, le muscle ou les cellules endothéliales (Masuda et al., 1999). L'activation d'Epo-R induit la différenciation de cellules endothéliales *in vitro* et exerce un puissant effet angiogénique *in vivo* (Ribatti et al., 1999). Le récepteur à l'Epo est aussi exprimé dans le système nerveux central et cette expression

augmente suite à un stress hypoxique (Juul et al., 1998) (Csete et al., 2004). Ce récepteur est de plus petite taille et présente une affinité pour l'Epo moindre que celui exprimé sur les érythroblastes, probablement du fait de modifications post-traductionnelles. Son activation est principalement paracrine, en raison d'une production locale d'Epo au niveau du système nerveux central (Ruscher et al., 2002). Mais elle peut être aussi secondaire à une administration exogène d'Epo (Brines et al., 2000). De nombreuses études chez le Rat ont démontré le rôle neuro-protecteur de l'Epo après ischémie cérébrale, dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale ou après traumatisme médullaire (Sakanaka et al., 1998) (Brines et al., 2000) (Siren et al., 2001) (Gorio et al., 2002) (Villa et al., 2003).

Chez l'Homme, l'administration systémique d'Epo après infarctus cérébral permet de réduire la taille des zones infarctées et d'améliorer l'évolution clinique à un mois (Ehrenreich et al., 2002). Un rôle protecteur de l'Epo dans l'ischémie myocardique a également été démontré : l'Epo-R est exprimé à la surface des cardiomyocytes. Son activation protège les cellules myocardiques de l'apoptose induite par une hypoxie prolongée et améliore la fonction ventriculaire et le remodelage après ischémie myocardique chez le Rat (Calvillo et al., 2003).

L'expression d'Epo-R a été retrouvée au sein de plusieurs types de tumeurs malignes (poumon, col de l'utérus, prostate, thyroïde, endomètre, sein, principales tumeurs pédiatriques). Certaines études ont suggéré que ce récepteur était fonctionnel (Arcasoy et al., 2002) et pourrait être activé par une production locale d'Epo au sein de la tumeur. L'activation d'Epo-R pourrait avoir dans les cellules cancéreuses deux conséquences opposées :

1- L'Epo pourrait, à la fois en corrigeant l'anémie et par ses effets locaux sur la vascularisation, améliorer l'oxygénation tumorale et donc diminuer l'hypoxie, facteur de résistance au traitement. Les anémies observées en cancérologie peuvent être liées à la maladie néoplasique par elle-même, aux facteurs de co-morbidité (dénutrition par exemple) ou encore aux traitements myélosuppresseurs, en particulier certaines chimiothérapies (telles que les sels de platine) et la radiothérapie. Dans les cancers ovariens ou encore les lymphomes agressifs, la fréquence des anémies nécessitant un soutien transfusionnel peut atteindre 50 à 60%. Cette anémie, source de fatigue, est un facteur influençant négativement la qualité de vie des patients, mais aussi un facteur pronostic péjoratif sur la survie de ces patients. Le traitement par Epo est donc recommandé, aussi bien par l'ASH (« American Society of Hematology ») que par l'ASCO (« American Society of Clinical Oncology »), en cas d'anémie liée à la chimiothérapie avec un taux d'hémoglobine inférieur à 10 g/dL (Rizzo et al., 2002). De nombreuses années d'utilisation

de l'Epo recombinante dans le traitement des anémies au cours des cancers ont prouvé les bénéfices de ce traitement en terme de niveau d'hémoglobine, de besoins transfusionnels et de qualité de vie (Seidenfeld et al., 2001) (Henry, 2004), voire en terme de survie globale (pour revue cf. (Bokemeyer and Foubert, 2004)). Indépendamment de son effet sur l'hématopoïèse, l'Epo pourrait améliorer la sensibilité du tissu tumoral aux traitements (Silver and Piver, 1999) (Stuben et al., 2001) (Thews et al., 2001), voire participer à la réduction tumorale dans le cas du myélome multiple (Mittelman et al., 2004) .

2- L'activation de l'Epo-R fonctionnel à la surface des cellules cancéreuses pourrait avoir dans d'autres cas des effets délétères, en activant la prolifération tumorale, en inhibant l'apoptose induite par l'hypoxie et en induisant l'angiogenèse (Acs et al., 2001) (Acs et al., 2002) (Acs et al., 2003) (Batra et al., 2003) (Acs et al., 2004). Deux études en double aveugle contre placebo ont conclu à un rôle délétère de l'Epo : dans les cancers de la sphère otho-rhino-laryngée (ORL) après radiothérapie (progression tumorale accrue et survie moindre sous Epoiétine bêta) (Henke et al., 2003) et dans les cancers du sein métastatiques (essai arrêté prématurément du fait d'une mortalité accrue sous Epoiétine alpha, avec risque accru d'accidents vasculaires thrombotiques) (Leyland-Jones, 2003). Mais ces études ne permettent pas de tirer de conclusions formelles du fait de biais de sélection dans leur recrutement et surtout de l'administration d'Epo à des taux d'hémoglobine très hauts par rapport aux recommandations habituelles (Bokemeyer and Foubert, 2004).

I.D.1.1.2.2.2. Expression hématopoïétique et structure du récepteur à l'érythropoïétine

L'Epo-R étant exprimé à faible taux sur les progéniteurs érythroïdes les plus immatures, la phase de détermination d'un progéniteur multipotent vers les premières étapes de l'érythropoïèse incluant les BFU-E (Wu et al., 1995b) n'est pas sous la dépendance de l'Epo mais d'un ensemble de cytokines non spécifiques de cette lignée, telles que le GM-CSF, l'IL-3 et -6 ou encore le SCF. C'est à partir du stade BFU-E mature et surtout CFU-E que l'expression de l'Epo-R est forte, et ce jusqu'au stade d'érythroblaste basophile. L'administration, *in vivo*, d'Epo influence faiblement le nombre de BFU-E. En revanche, l'administration d'Epo augmente de façon exponentielle le nombre de CFU-E et les précurseurs érythroïdes jusqu'au stade d'érythroblaste basophile, principalement en prévenant leur apoptose. Cette phase tardive de l'érythropoïèse, caractérisée à la fois par une amplification majeure des cellules et par leur spécialisation fonctionnelle dans la synthèse d'hémoglobine, est sous la dépendance exclusive de l'Epo. Ceci explique le phénotype des souris *Epo*^{-/-} ou *Epo-R*^{-/-} : les progéniteurs érythroïdes immatures sont présents chez ces

souris, mais leur maturation terminale est totalement bloquée au stade CFU-E et les embryons meurent *in utero* d'anémie profonde (Wu et al., 1995a).

Le gène *Epo-R* a été cloné en 1989 chez la souris et en 1990 chez l'Homme (D'Andrea et al., 1989) (Jones et al., 1990). Chez l'Homme, il est situé sur le chromosome 19 et code pour une protéine de 55 kDa constituée de 508 acides aminés. Sa structure l'apparente à la superfamille des récepteurs aux cytokines de type 1. Comme tous les membres de ce groupe de récepteurs, il est constitué de 3 domaines:

- Une partie extracellulaire comportant deux domaines fonctionnels D1 et D2 (Livnah et al., 1996). Le domaine D1 contient plusieurs résidus cystéine impliqués dans la dimérisation du récepteur. Dans la partie juxta-membranaire du domaine D2 se trouve le motif WSXWS qui joue un rôle crucial dans la conformation du récepteur à la surface cellulaire, dans la liaison au ligand et la transduction du signal (Yoshimura et al., 1992) .

- Un domaine transmembranaire unique. Celui-ci contient deux résidus leucine en 240 et 241 dont la présence est essentielle à la dimérisation du récepteur : une mutation de ces résidus qui inhibe cette dimérisation altère la transduction du signal Epo (Kubatzky et al., 2001).

- Un domaine intracellulaire dénué de toute activité tyrosine kinase intrinsèque. Il comporte dans sa portion juxta-membranaire deux séquences conservées : Les «box» ou boîte 1 et 2. La boîte 1 joue un rôle essentiel dans la transduction du signal. Elle est impliquée dans l'ancrage de la phosphotyrosine JAK2 (Janus Kinase 2), pivot central de la signalisation Epo (Jiang et al., 1996). Le domaine intracytoplasmique de Epo-R comporte par ailleurs huit résidus tyrosine impliqués dans le recrutement et l'activation de protéines effectrices de la transduction du signal (Figure E5).

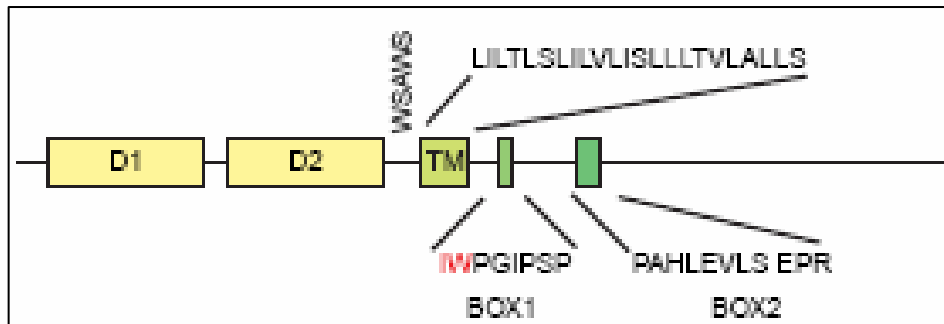


Figure E5 : Structure du récepteur à l'Erythropoïétine

(tiré de Richmond et al, 2005)

Le domaine extracellulaire peut être divisé en deux sous-domaines appelés D1 et D2. TM (domaine Transmembranaire). La portion juxtamembranaire du domaine intra-cellulaire comprend 2 séquences conservées : Box1 et 2. Box 1 est impliquée dans l'ancrage de JAK2.

Epo-R tyrosine	SH2 associated proteins
Y343	STAT5
Y401	STAT5, SHIP-1, Shp2, Cis, SOCS-3
Y429	Shp1
Y431	Shp1, STAT3
Y443	None identified
Y460	Couples to Epo-dependent TRPC2 activation
Y464	Grb2
Y479	p85α subunit of PI-3 kinase

Le récepteur à l'Erythropoïétine comporte huit résidus tyrosine impliqués dans le recrutement et l'activation de protéines effectrices de la transduction du signal.

Un second type de récepteur Epo a été décrit : Il résulte d'un épissage alternatif de l'ARN prémessager entraînant l'apparition d'un codon STOP prématuré. Il en résulte la synthèse d'une protéine tronquée dans son domaine intracytoplasmique. Ce récepteur, plus spécifiquement exprimé dans la population de progéniteurs érythroïdes la plus immature, n'est pas fonctionnel, mais agirait comme un dominant négatif sur le signal mitogénique transmis par l'Epo-R complet (Nakamura et al., 1992).

Les progéniteurs et précurseurs érythroïdes ont des sensibilités très variées à l'Epo. Ces sensibilités variables à l'Epo sont dues aux variations exponentielles de concentrations d'Epo sérique trouvé physiologiquement ou lors des anémies. A faible concentration d'Epo, seuls les progéniteurs les plus sensibles peuvent survivre. Ainsi, la régulation de l'apoptose des progéniteurs et des précurseurs érythroïdes pendant leur phase de dépendance à l'Epo explique la réponse rapide mais très finement régulée des populations érythroïdes à l'hypoxie, l'hyperoxie et l'anémie, sans aucun effet sur la différenciation cellulaire ou la mise en cycle de l'Epo. Dans ce modèle, l'Epo module le taux d'apoptose des progéniteurs et précurseurs érythroïdes. Ainsi, l'érythropoïèse est principalement régulée de façon endocrine, la cible étant la moelle osseuse et la glande productrice d'Epo le rein (Figure E4).

I.D.1.2. Régulation positive de l'érythropoïèse au niveau moléculaire

I.D.1.2.1. Stem cell factor et c-kit

La liaison du ligand SCF à c-kit entraîne la dimérisation du récepteur et induit la phosphorylation des résidus tyrosines intracytoplasmiques et le recrutement des protéines à domaine SH2 (« Src Homology 2 ») impliquées dans la transduction du signal. Plusieurs voies de signalisation sont activées, parmi lesquelles PI3K/AKT (PI3K, Phosphatidylinositol 3-kinase), la phospholipase C γ (PLC- γ), la voie Grb2-Ras-MAPK (GRB2, « Growth factor Receptor-bound protein 2 ») (Ras, Rous Sarcoma kinase) ou encore les Src kinases. Les voies p85 α /PI3K/AKT et Src kinases semblent prédominantes dans la lignée érythroïde. Les souris p85 $^{-/-}$ ont un nombre de BFU-E et CFU-E diminué (pour revue voir (Munugalavadla and Kapur, 2005)).

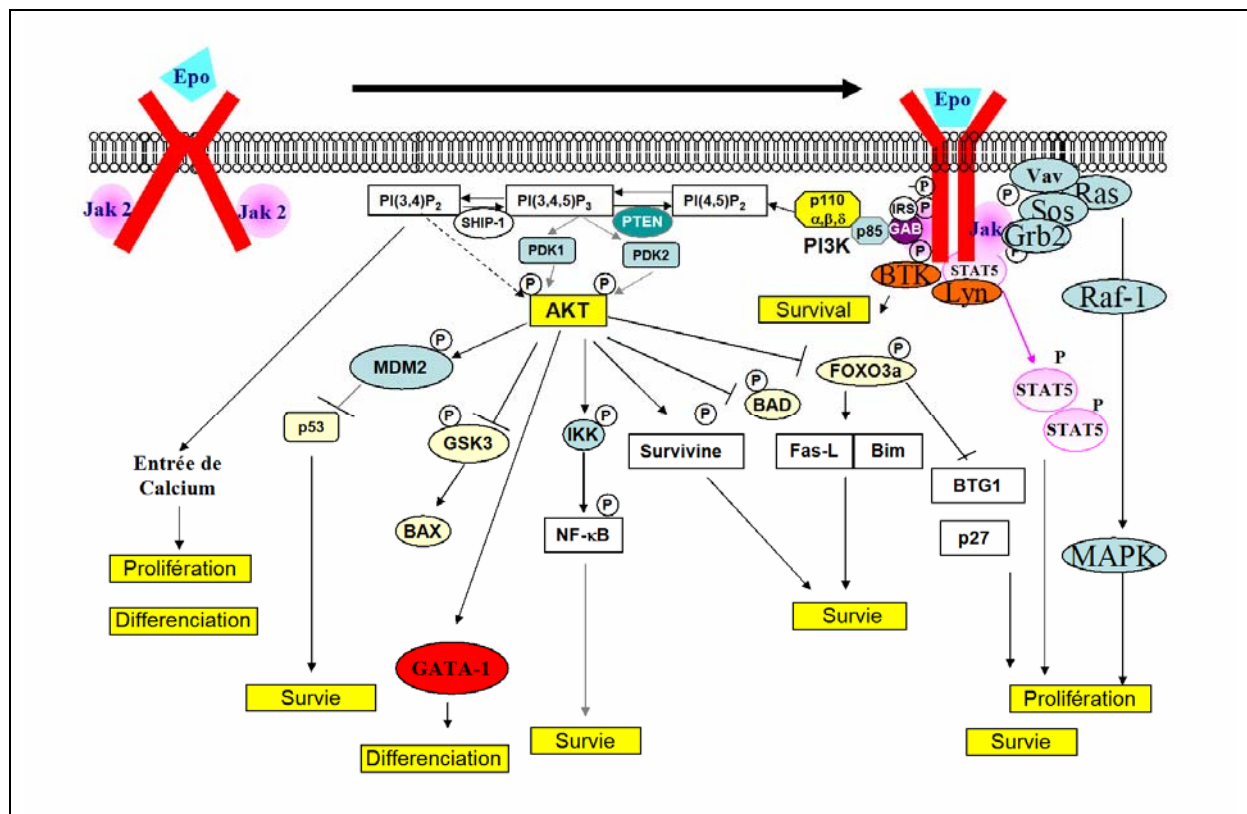


Figure E6 : Epo-R et son rôle dans la survie, la prolifération et la différenciation

I.D.1.2.2. L'érythropoïétine et son récepteur

Le récepteur de l'Epo est présent à la surface des BFU-E et des CFU-E sous la forme d'homodimères. La fixation de l'Epo induit un changement de conformation et l'activation de la tyrosine kinase JAK2 qui est pré-associée au domaine cytoplasmique du récepteur, dans sa région juxta-membranaire. La protéine JAK2 est le pivot de la signalisation Epo et est absolument nécessaire à l'activation d'Epo-R. C'est un membre de la famille Janus Kinase, possédant une activité tyrosine kinase intrinsèque.

En effet, les souris JAK2^{-/-} ont un phénotype identique aux souris Epo-R^{-/-}. JAK2, en association avec d'autres kinases telles que Lck (« Leukocyte-specific protein tyrosine kinase »), Lyn (« Lck/yes-related novel tyrosine kinase »), Btk (« Bruton's Tyrosine Kinase »), et/ou c-kit, va moduler la phosphorylation des 8 résidus tyrosines cytoplasmiques du récepteur, situés dans sa partie distale (Figure E5). Ces tyrosines phosphorylées vont recruter des effecteurs à domaines SH2 : STAT5 (STAT, « Signal Transducer and Activator of Transcription »), Cis (« Cytokine inducible SH2-containing protein »), SHP-1 (« Small Heterodimer Partner »), SHP-2, SHIP (« SH2-containing Inositol Phosphatase »), Grb2, Lyn, la sous-unité p85 de la PI-3 kinase et les protéines de la famille SOCS (pour revue voir (Richmond et al., 2005)) (Figure E6). En outre, d'autres molécules de transduction du signal se fixant à Epo-R ont également été identifiées, incluant les tyrosine kinases Syk (« Spleen tyrosine kinase »), Tec, PLC-γ, les protéines adaptatrices Shc, Cbl (« Casitas B-lineage Lymphoma »), Crkl, IRS-2 (« Insulin Receptor Substrate 2 ») et Gab1/2 (« GRB2-Associated Binding protein »), et les molécules d'échange nucléotidique Sos 1 (« Son of sevenless homolog 1 ») et Vav. Les rôles physiologiques de la cascade de transduction du signal initiée *via* la phosphorylation des résidus tyrosines de l'Epo-R ne sont pas encore totalement élucidés. Il semble bien établi que les voies activées par le récepteur de l'Epo permettent la prolifération et la survie des cellules par l'intermédiaire des voies JAK2-STAT5, PI3-Kinase, Ras/MAP Kinases, l'entrée intracellulaire de calcium et d'autres molécules impliquées dans la transduction du signal (Figure E6).

I.D.1.2.3. Synergie entre c-kit et le récepteur à l'érythropoïétine au niveau moléculaire

L'Epo et le SCF agissent de façon synergique, au niveau moléculaire, pour amplifier l'érythropoïèse. Le SCF sensibilise les cellules à l'Epo et ainsi le taux d'Epo nécessaire à la prolifération érythroïde et à la survie est moindre. Parallèlement, le SCF ralentit la différenciation des progéniteurs érythroïdes, permettant ainsi l'expansion des cellules érythroïdes.

Au stade des progéniteurs érythroïdes, les voies de signalisation activées par c-kit pourraient agir de façon synergique avec les voies induites par l'Epo-R (cf. infra, pour revue voir (Arcasoy and Jiang, 2005)). Epo-R et c-kit sont co-exprimés à la surface des précurseurs depuis les BFU-E matures jusqu'aux érythroblastes polychromatophiles, mais leur expression suit une cinétique inverse. Ceci peut témoigner d'une régulation croisée de l'expression de ces deux récepteurs à la surface des précurseurs érythroblastiques. *In vitro*, alors que seule l'Epo est capable de produire des érythrocytes humains par l'amplification et la maturation de progéniteurs, la combinaison de l'Epo et du SCF permet d'accroître fortement, la prolifération et l'expansion des cellules érythroïdes. Une exposition des progéniteurs érythroïdes au SCF serait ainsi un pré requis nécessaire à l'action de l'Epo sur ces cellules (Wu et al., 1995a) (Wu et al., 1997). La synergie entre ces deux récepteurs implique une interaction directe entre c-kit et la boîte 2 du domaine intra-cytoplasmique d'Epo-R (Wu et al., 1995a). Cette interaction active Epo-R non pas en induisant sa dimérisation, mais en phosphorylant directement ses résidus tyrosines intra-cytoplasmiques (Wu et al., 1995a) (Tan et al., 2003). Il semble que le résidu Y343, qui fixe STAT5a, soit impliqué dans la synergie avec c-Kit. Les résidus tyrosines de c-kit qui fixent les Src kinases seraient suffisants pour la co-signalisation avec Epo-R (Hong et al., 2008). Cependant, les effets de l'Epo et du SCF sont décrits comme étant distincts et séquentiels sur la différenciation érythroïde. L'effet sur la prolifération ou la mort cellulaire de la co-signalisation entre l'Epo et le SCF n'est pas établi comme étant nécessaire au cours de la différenciation érythroïde. Ainsi, le SCF induit la prolifération des cellules immatures, tandis que l'Epo a pour rôle principal la survie et la différenciation des progéniteurs érythroïdes (Wang et al., 2008).

La seule activation d'Epo-R par c-kit dans les précurseurs érythroïdes ne suffit pas à activer la signalisation de ce récepteur en l'absence d'Epo. Elle ne fait que la potentialiser. Plusieurs mécanismes ont été évoqués. Au niveau moléculaire, le SCF et l'Epo augmentent de façon synergique l'ampleur et la durée de la voie MAPKinase (MAPK, ERK1/2) (ERK, « Extracellular signal Regulated Kinase »), ce qui induit la prolifération et ralentit la différenciation des cellules érythroïdes (Sui et al., 1998). L'activation prolongée de MAPK pourrait aussi jouer un rôle dans la prévention de l'apoptose. Cependant, le SCF et l'Epo peuvent activer les MAPKinases par des voies différentes et leurs cibles en aval peuvent ne pas être identiques. L'effet synergique de l'Epo et du SCF sur la survie cellulaire peut aussi avoir lieu à d'autres niveaux moléculaires. Par exemple, le SCF, en activant la PI-3 kinase, induit une forte activation d'AKT et ainsi la phosphorylation de Bad (« Bcl2-associated agonist of cell death ») et sa séquestration dans le

cytosol par la protéine 14-3-3 ; ce qui permet la libération de Bcl-x_L de la membrane mitochondriale pour protéger la cellule de l'apoptose.

Dans ce modèle de synergie, l'expression de Bcl-x_L est augmentée par la voie JAK/STAT activée par l'Epo-R et son activité est augmentée par c-kit. De même, la transactivation de STAT est augmentée via l'activation de la voie PKA/CREB (PKA, Protéine Kinase A), induit par c-kit et le recrutement de CBP/p300 (Boer et al., 2003). De multiples autres voies pourraient également être impliquées dans l'effet synergique majeur observé entre le SCF et l'Epo restent à décrire.

Enfin, le SCF est également impliqué dans la réponse érythroïde de stress, caractérisée par l'amplification d'une population particulière de progéniteurs érythroïdes capables de proliférer rapidement en réponse à une anémie aiguë (Lenox et al., 2005). Cette réponse proliférative rapide implique, pour être optimale, une coopération entre le SCF, l'hypoxie et la signalisation BMP4/Smad (BMP4, « Bone Morphogenetic Protein 4 ») (Perry et al., 2007).

I.D.1.2.2.1. Activation du récepteur à l'érythropoïétine et transduction du signal

I.D.1.2.2.1.1. Liaison du ligand et activation de JAK2

En absence d'Epo, le récepteur, présent à la surface cellulaire, est inactif : il est sous forme dimérique ou oligomérique dans une conformation spatiale impropre à son activation (Constantinescu et al., 2001). Lorsque l'Epo se fixe sur son récepteur, elle induit une modification conformationnelle de celui-ci (Syed et al., 1998). Il en résulte un rapprochement ou un mouvement de rotation des deux domaines intracytoplasmiques du dimère, pré-requis nécessaire à la transduction du signal (Figure E6).

A noter que l'activation optimale du signal Epo nécessite, en plus de la liaison du ligand, le recrutement d'autres récepteurs exprimés à la surface cellulaire : la chaîne β du récepteur à l'IL-3 interagit avec Epo-R à la surface cellulaire et optimise la transduction du signal (Jubinsky et al., 1997). C-kit participe également à la phosphorylation d'Epo-R en interagissant directement avec le domaine intracytoplasmique de celui-ci (cf. supra). D'autres récepteurs peuvent être recrutés par Epo-R et participent à l'activation des voies de signalisation dans les précurseurs érythroïdes : RON (Récepteur d'Origine Nantais) par exemple, un récepteur tyrosine kinase qui, en phosphorylant Gab-1, induit l'activation des voies de signalisation MAPK et AKT/PKB (Protéine Kinase B) et favorise l'expansion des progéniteurs érythroïdes (van den Akker et al., 2004). Le recrutement de ces récepteurs participant à la transduction du signal permet de comprendre pourquoi les souris exprimant un récepteur Epo-R tronqué de tous ses résidus tyrosine intracytoplasmiques restent viables sans syndrome anémique majeur (Zhang et al., 2001). Le

rapprochement des domaines intracytoplasmiques d'Epo-R, après activation par le ligand, induit une transphosphorylation des protéines JAK2. La protéine JAK2 est le pivot de la signalisation Epo. C'est un membre de la famille Janus Kinase, possédant une activité tyrosine kinase intrinsèque.

A la surface des cellules hématopoïétiques, JAK2 se lie par son domaine FERM à de nombreux récepteurs de cytokines, dépourvus d'activité tyrosine kinase intrinsèque comme Epo-R, c-mpl, G-CSF-Récepteur (G-CSF (« Granulocyte Colony Stimulating Factor »), IFN γ - Récepteur (IFN, Interféron) ou encore IL-3-R et la famille Gp130 (Glycoprotéine 130) (Parganas et al., 1998).

JAK2 contient sept domaines JH (JAK Homology). A l'extrémité C-terminale se trouvent les domaines kinases JH-1 (porteur de l'activité catalytique) et pseudo-kinase JH2, tandis que les domaines JH3 à JH7 contiennent le domaine SH2 recrutant les protéines par leur résidu tyrosine et le domaine FERM impliqué dans la liaison à l'Epo-R. En l'absence de stimulation par l'Epo, JAK2 est non phosphorylé, inactif, mais déjà associé à Epo-R par sa partie N-terminale. La liaison de JAK2 par son domaine FERM à la boîte 1 du récepteur est précoce, dès le réticulum endoplasmique (RE) et est nécessaire au «processing » d'Epo-R à la surface cellulaire (Huang et al., 2001). L'activation du récepteur entraîne la transphosphorylation de JAK2 au niveau de sa boucle d'activation (sur les résidus tyrosines 1007 et 1008), ce qui libère sa fonction tyrosine kinase et lui permet de phosphoryler en retour les 8 résidus tyrosines du domaine intracytoplasmique d'Epo-R (Witthuhn et al., 1993). L'activation de JAK2 est une étape essentielle à la transduction du signal. En effet, les souris invalidées pour ce gène ne sont pas viables : les embryons meurent entre 11 et 12 jours de gestation avec un tableau d'anémie sévère assez proche de celui observé chez les souris Epo^{-/-} ou Epo-R^{-/-} (Neubauer et al., 1998) .

Une activation constitutive de JAK2 a récemment été mise en évidence dans la physiopathologie de syndromes myéloprolifératifs Bcr-Abl négatifs (Bcr, « Breakpoint cluster region ») (Abl, « Abelson »), en particulier la polyglobulie de Vaquez. La polyglobulie de Vaquez ou *polycythemia vera* est une maladie clonale de la cellule souche hématopoïétique dont l'expression hématologique prédomine sur la lignée érythroïde. Les progéniteurs des patients atteints de maladie de Vaquez forment des colonies spontanées *in vitro*, en l'absence d'Epo (Prchal and Axelrad, 1974). Ces colonies spontanées reflètent l'indépendance des précurseurs à l'Epo et sont appelées « Erythroid Endogenous Colony » (EEC). Ces progéniteurs de polyglobulie de Vaquez se caractérisent à la fois par leur indépendance à l'Epo et par une hypersensibilité à de nombreuses cytokines: Epo, SCF, GM-CSF, IL-3 et IGF-1 mais aussi Tpo (Casadevall et al.,

1982) (Dai et al., 1992) (Dai et al., 1994). La formation des EEC nécessite l'activation des mêmes voies de signalisation que celles activées par l'Epo : les inhibiteurs chimiques de JAK2, PI3-K et Src-kinase inhibent la différenciation érythroïde Epo-indépendante des progéniteurs de patients atteints de polyglobulie de Vaquez (Ugo et al., 2004). Il a récemment été identifié une mutation du domaine pseudo-kinase de JAK2 dans la grande majorité des polyglobulies de Vaquez (95%) et plus de la moitié des thrombocythémies essentielles et des myélofibroses primitives (Baxter et al., 2005) (James et al., 2005) (Kralovics et al., 2005) (Levine et al., 2005) (Zhao et al., 2005). Cette mutation JAK2^{V617F} substitue d'une valine par une phénylalanine en position 617 au niveau du domaine pseudo-kinase JH-2 (pour revue, cf. (Delhommeau et al., 2006)). La protéine JAK2 est phosphorylée de façon constitutive sur la tyrosine Y1007 et active en aval les voies de transduction impliquées dans la signalisation Epo (James et al., 2005) (Lu et al., 2005) (Staerk et al., 2005). Sur le plan cellulaire, l'expression forcée de JAK2^{V617F} dans plusieurs modèles de lignées cellulaires induit la prolifération indépendamment de la présence de facteurs de croissance (James et al., 2005).

I.D.1.2.2.1.2. Phosphorylation des résidus tyrosines intracytoplasmiques

Les tyrosines intracytoplasmiques phosphorylées par JAK2 servent de point d'ancrage aux protéines à domaine SH2 impliquées dans la transduction du signal. De nombreuses voies de signalisation intracellulaire sont ainsi activées (Wojchowski et al., 1999). La plupart de ces voies stimulent la prolifération et/ou la survie des progéniteurs érythroïdes : la voie PI3-Kinase (Miura et al., 1994a) (Damen et al., 1995), la voie des ras-MAP Kinase (Miura et al., 1994b), les voies Lyn (Chin et al., 1998) ainsi que plusieurs membres de la famille de facteurs de transcription STAT, en particulier STAT5 (Wakao et al., 1995), qui permet l'induction de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L indispensable à la survie des progéniteurs érythroïdes (Socolovsky et al., 1999). L'activation d'Epo-R entraîne également le recrutement de protéines ayant un effet inhibiteur sur la transduction du signal : la voie Cis/SOCS qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la phosphorylation de JAK2 (Yoshimura et al., 1995) ou encore la phosphatase SH-PTP1, recrutée par la tyrosine la plus distale de Epo-R (Klingmuller et al., 1995). Des mutations germinales d'Epo-R, caractérisées par la délétion de cette partie C-terminale inhibitrice, sont impliquées dans la physiopathologie de certaines polyglobulies primitives familiales.

Des expériences de mutations successives du récepteur Epo-R murin ont permis d'analyser le rôle respectif des 8 résidus tyrosines dans la transduction du signal Epo (cf. tableau ci-contre, (Richmond et al., 2005)). De façon surprenante, contrairement à la protéine JAK2, aucun de ces

résidus n'est indispensable à la signalisation Epo : en effet, les souris knock-in exprimant un récepteur Epo-R tronqué de tous ces résidus tyrosines sont viables. Elles ne présentent qu'une diminution modérée de l'hématocrite et du potentiel clonogénique érythroïde (Zang et al., 2001). Cependant, leur réponse à l'érythropoïèse de stress, après induction d'une anémie hémolytique par la phénylhydrazine, est profondément altérée. En revanche, celle-ci persiste si le récepteur conserve son résidu tyrosine Y343 responsable du recrutement de STAT5 (Menon et al., 2006). Le déficit secondaire à la perte des résidus tyrosines, n'est donc pas qualitatif (la signalisation Epo est fonctionnelle), mais uniquement quantitatif (elle est atténuée) (Figure E5)

I.D.1.2.2.1.3. Principales voies de signalisation du récepteur à l'érythropoïétine

I.D.1.2.2.1.3.1. La voie STAT5a-b

La signalisation Epo implique plusieurs membres de la famille de facteurs de transcription STAT (Constantinescu et al., 1999) (Wojchowski et al., 1999) (Cheung and Miller, 2001). Cette famille STAT se caractérise par une structure moléculaire hautement conservée avec un domaine de liaison à l'ADN et une extrémité C-terminale contenant un motif SH2, un résidu tyrosine essentiel à l'activation de la protéine et un domaine de transactivation. Le domaine de liaison à l'ADN reconnaît la séquence consensus GAS (« γ -IFN Activated Sequences ») TTC(N)3GAA située sur les régions cis-régulatrices de nombreux gènes cibles. Trois membres de la famille STAT sont impliqués dans la signalisation Epo : STAT1, STAT3 et STAT5 (Figure E7). Les études sur lignées cellulaires ont montré que l'activation de STAT1 dépend de JAK2. Les souris STAT1^{-/-} présentent une diminution du nombre de précurseurs érythroïdes et un déplacement de l'érythropoïèse de la moelle osseuse vers la rate, reflet d'une érythropoïèse de stress (Halupa et al., 2005). STAT3 est également phosphorylé en réponse à l'Epo dans les lignées érythroïdes, mais son rôle précis reste à ce jour peu connu (Kirito et al., 2002).

STAT5 est le membre de cette famille de loin le mieux caractérisé dans l'érythropoïèse. Il existe sous deux isoformes : STAT5a et STAT5b, présentant plus de 96% d'homologies au niveau protéique (pour revue, cf. (Hennighausen and Robinson, 2008)). STAT5a et b sont impliqués dans la transduction du signal de nombreuses cytokines : les hormones de croissance, la prolactine ou l'IL-2. Ceci explique le phénotype pléomorphe observé chez les souris double knock-out *STAT5a/b*^{-/-}. La phosphorylation du résidu tyrosine 343 de l'Epo-R par JAK2 (et moins spécifiquement du résidu 401) recrute les deux isoformes STAT5a et STAT5b *via* leur domaine SH2 et les phosphoryles en retour. Cette phosphorylation induit la formation d'homo ou d'hétérodimères STAT5a/b puis leur translocation nucléaire.

Les dimères STAT5 se fixent sur les séquences consensus GAS et activent l'expression de leurs gènes cibles impliqués dans la survie cellulaire, la prolifération et la différenciation. L'activation de STAT5 est suffisante pour induire la maturation érythroïde terminale. Un récepteur Epo-R «chimère» (Epo-R-H), dont la partie intracytoplasmique ne comprend que la boîte JAK2 et la tyrosine 343 et ne conserve seulement la capacité d'activer STAT5, et auquel manquent toutes les autres tyrosines nécessaires à l'activation des autres voies de transduction du signal, permet la maturation de CFU-E murin (Miller et al., 1999b). La mutation supplémentaire de la tyrosine 343 de la boîte JAK2 nécessaire à l'activation STAT5 (Epo-R-HM) permet aussi la formation de colonies érythroïdes *in vitro* (Miller et al., 2002). Ces colonies sont néanmoins trois fois moins nombreuses que lorsque le résidu Y343 est conservé (Epo-R-H), reflétant probablement l'excès d'apoptose des érythroblastes en l'absence d'activation de STAT5. Ces résultats sont confirmés *in vivo*: les souris knock-in exprimant Epo-R-H ou Epo-R-HM sont viables (Zang et al., 2001). En revanche, la réponse à l'érythropoïèse de stress d'Epo-R-HM est fortement altérée alors qu'elle est normale chez les souris Epo-R-H (Menon et al., 2006) (Zang et al., 2001). Les embryons de souris double knock-out *STAT5a/b*^{-/-} (Cui et al., 2004) ne sont pas viables et présentent un taux d'hématocrite effondré à 18,5 jours de vie embryonnaire et d'autre part le siRNA STAT5 inhibe la formation des CFU-E (Garcon et al., 2006). Ces observations, qui peuvent sembler contradictoires avec le phénotype des souris *STAT5*^{-/-}, reflètent probablement l'activation directe de STAT5 par JAK2, indépendamment des résidus tyrosine d'Epo-R. Par ailleurs, il a récemment été décrit que STAT5 serait impliqué dans la stimulation de nouveaux facteurs anti-apoptotiques comme Pim1, Pim3, Irs-2, Serphin-3G, et Trb3 (Sathyanarayana et al., 2008). Il a également été décrit que l'utilisation d'un dominant négatif de STAT5 induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des précurseurs érythroïdes (Chida et al., 1999). Il a récemment été montré que STAT5 est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire en modulant l'expression des gènes du cycle cellulaire, en diminuant l'expression des inhibiteurs : Cycline G2, de p27/Cdkn1b (« Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 1b »), et de Bcl6 (« B-cell leukemia/lymphoma 6 »), et aussi *via* l'induction de la Cycline D2 (Fang et al., 2007).

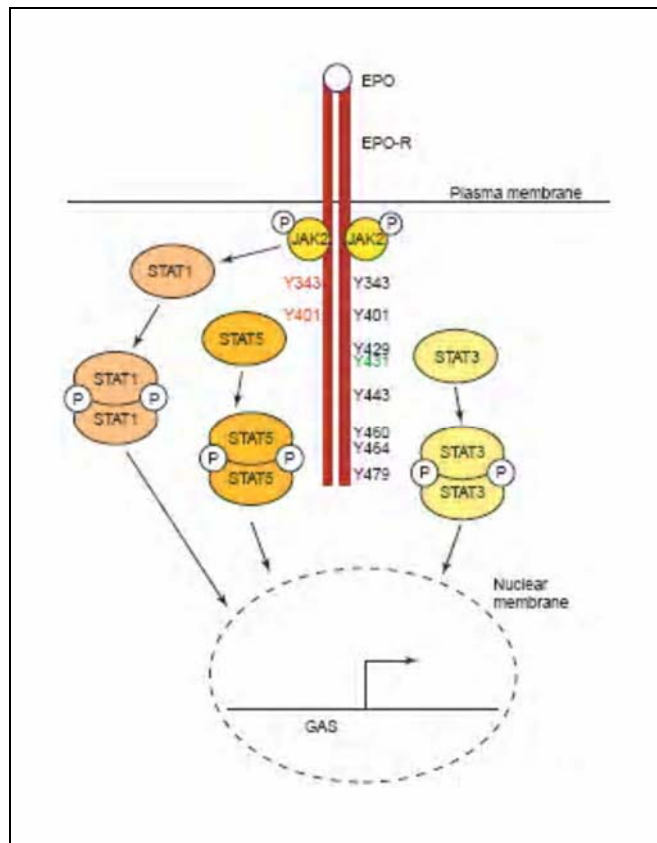


Figure E7 : Voies de transduction du signal JAK-STAT induites après activation d'Epo-R par fixation d'Epo

(tiré de Richmond et al, 2005)

En conclusion, la voie de signalisation STAT5 semble avant tout impliquée dans la survie des progéniteurs au cours de la différenciation érythroïde terminale. Un rôle spécifique dans la différenciation cellulaire ne peut cependant être exclu : dans les cellules érythroleucémiques SKT6, l'activation de STAT5 est nécessaire à la synthèse d'hémoglobine (Gregory et al., 1998) et l'expression d'une forme constitutivement activée de STAT5 (STAT5CA) ou la surexpression de Bcl-x_L induit la différenciation érythroïde malgré l'absence d'Epo, mimant l'aspect observé dans les polyglobulies de Vaquez (Garcon et al., 2006).

Bcl-x_L est un gène cible majeur de STAT5 dans les précurseurs érythroïdes (cf. infra). Bcl-x_L est un membre de la famille des protéines apparentées à Bcl-2 impliquées dans le contrôle de la mort cellulaire par apoptose. Leur principale fonction est d'assurer l'intégrité et l'adaptation de la mitochondrie aux différentes perturbations du métabolisme cellulaire. Les études d'inactivation génique ont montré que les membres de la famille Bcl-2 jouent un rôle physiologique unique et non redondant selon le type cellulaire. Bcl-2, par exemple, protège de l'apoptose les cellules rénales, les lymphocytes matures et les mélanocytes alors que Bcl-w agit au niveau des cellules germinales et A-1 au niveau des granulocytes (Pour revue, cf.(Adams and Cory, 2007)). Bcl-x_L est essentiel à la survie des cellules neuronales et des précurseurs érythroïdes. L'expression de Bcl-x_L augmente lors de l'induction de la différenciation érythroïde terminale. Bcl-x_L joue un rôle essentiel dans la survie des précurseurs érythroblastiques tardifs, au stade où la synthèse d'hémoglobine est maximale. Les progéniteurs spléniques murins infectés par le virus de Friend et bloqués au stade proérythroblastique expriment faiblement Bcl-x_L, mais cette expression augmente dès l'induction de leur différenciation terminale *in vitro* par l'Epo (Gregoli and Bondurant, 1997). Lors de la différenciation érythroïde, *in vitro*, de précurseurs CD34⁺ humains en milieu liquide, l'expression de Bcl-x_L augmente à partir du stade BFU-E jusqu'à un maximum dans les érythroblastes polychromatophiles, pour ensuite décliner en fin de maturation (Testa, 2004). L'expression de Bcl-x_L est également induite lors de la maturation mégacaryocytaire. Elle reste, en revanche, faible lors de la maturation des neutrophiles. Bcl-2 présente un profil d'expression inverse à Bcl-x_L dans l'hématopoïèse : son expression est faible dans les lignées érythroïdes et mégacaryocytaires mais forte dans la granulopoïèse.

La sévérité du phénotype observé chez les souris *bcl-X*^{-/-} illustre l'importance de Bcl-x_L au cours du développement. Les souris *bcl-X*^{-/-} meurent à 13 jours de vie embryonnaire, présentant une apoptose massive à la fois au niveau des cellules du système nerveux central et des précurseurs

érythroïdes du foie fœtal (Motoyama et al., 1999). La culture d'érythroblastes n'exprimant pas Bcl-x aboutit à une érythropoïèse inefficace (Motoyama et al., 1999). La délétion du gène bcl-x spécifique à la lignée érythroïde (Wagner et al., 2000) aboutit à une anémie sévère caractérisée par une érythropoïèse inefficace, avec une apoptose massive des érythroblastes matures synthétisant de l'hémoglobine et une hyperplasie des progéniteurs mégacaryocytaires et érythroïdes dans la moelle osseuse et la rate.

L'inactivation conditionnelle de Bcl-x_L après la naissance des souris induit l'apparition, à trois mois de vie, d'une anémie hémolytique sévère à laquelle s'associe une thrombopénie. On observe une accumulation de précurseurs érythroblastiques dans la moelle osseuse et dans la rate, associée à une hyper-réticulocytose dans le sang (Wagner et al., 2000). L'analyse détaillée de l'hématopoïèse de ces souris montre que cette réticulocytose est relative, insuffisante par rapport au degré d'hyperplasie érythroblastique dans les organes hématopoïétiques (Rhodes et al., 2005b). Le nombre de progéniteurs érythroïdes Ter119⁺ apoptotiques est nettement accru, témoignant d'une érythropoïèse inefficace.

En présence d'Epo, l'expression de Bcl-x_L est fortement augmentée lors de la différenciation érythroïde terminale, atteignant son maximum pendant la phase d'hémoglobiniisation (Josefsen et al., 2000). La privation en Epo induit la mort apoptotique des progéniteurs érythroïdes en culture (Koury and Bondurant, 1990), alors que la surexpression de Bcl-x_L en absence d'Epo entraîne la survie et la différenciation des progéniteurs érythroïdes (Dolznic et al., 2002). La privation en Epo conduit à l'activation de la caspase-3 et à l'apoptose des érythroblastes (Gregoli and Bondurant, 1999). Il a aussi été rapporté que la caspase-3 cliverait Bcl-x_L, (Negoro et al., 2001) ce qui suggère que l'Epo protégerait les cellules érythroïdes de l'apoptose, en partie, *via* l'inhibition du clivage de Bcl-x_L par la caspase-3 (Testa, 2004). L'Epo, *via* l'activation des voies ERK1 et ERK2, inhiberait le clivage de Bcl-x_L par les caspases, aboutissant ainsi à la protection des cellules érythroïdes de l'apoptose (Mori et al., 2003). ERK inhiberait également l'expression de Fas à la surface des érythroblastes (Rubiolo et al., 2006).

Le mécanisme d'induction de l'expression de Bcl-x_L est à l'intersection des voies de signalisation de l'Epo et du facteur de transcription GATA-1, *via* l'activation de la voie JAK2/STAT5 (Testa, 2004) (cf. infra). Les mécanismes moléculaires à l'origine de l'induction par l'Epo de Bcl-x_L dans les phases terminales de l'érythropoïèse restent imparfaitement connus. L'induction de Bcl-x_L est une des conséquences majeures de l'activation de STAT5 par JAK2 (Socolovsky et al., 1999). Plusieurs arguments expérimentaux prouvent que STAT5 induit l'expression de Bcl-x_L : des sites

consensus GAS sur lesquels se fixe STAT5 *in vitro* ont été identifiés dans le premier intron des gènes *bcl-XL* humains et murins (Socolovsky et al., 1999). Il a été montré que l'Epo induit l'activité transcriptionnelle du promoteur Bcl-XL, mais cette induction est perdue lorsque les séquences GAS sont mutées. L'utilisation d'un dominant négatif de STAT5 inhibe l'induction de Bcl-XL par l'Epo dans les cellules HCD-57. Une forme constitutionnellement active de STAT5 permet, au contraire, une expression permanente de Bcl-XL dans ces cellules, même en l'absence d'Epo (Socolovsky et al., 1999).

La régulation de Bcl-XL dans l'érythropoïèse n'est pas sous la seule dépendance de STAT5. La persistance d'une érythropoïèse résiduelle chez les souris *STAT5a/b*^{-/-} témoigne bien de l'existence de voies de signalisation alternatives. Le promoteur du gène *Bcl-XL* contient plusieurs régions régulatrices putatives correspondant aux séquences consensus de liaison à l'ADN de plusieurs facteurs transcriptionnels : GATA-1, ets-1, AP-1 ou encore de NF-E2 (Grillot et al., 1997). GATA-1, en particulier, semble jouer un rôle important dans le contrôle de l'expression de BCL-XL. Les cellules G1E-ER sont dérivées de cellules ES *GATA-1*^{-/-} et correspondent à des précurseurs bloqués au stade proérythroblastique. L'expression de GATA-1 dans ces cellules est inductible en présence d'œstrogènes, ce qui permet de rétablir la différenciation érythroïde terminale. Lorsque ces cellules sont cultivées en présence d'œstrogènes, l'expression de Bcl-XL augmente et non pas celle de Bcl-2 ce qui serait un des mécanismes responsables des effets anti-apoptotiques de GATA-1 au cours de la différenciation érythroïde (Gregory et al., 1999). Un site de liaison GATA-1 est présent sur le promoteur du gène *bcl-XL*. Les expériences d'immunoprécipitation ont montré une fixation *in vivo* de GATA-1 sur ce promoteur, évoquant une régulation transcriptionnelle directe de Bcl-XL par GATA-1 dans les cellules érythroïdes (Kuo and Chang, 2007).

L'expression forcée de Bcl-XL induit une différenciation érythroïde terminale dans la lignée murine pluripotente FDCP (Haughn et al., 2003) ou dans les progéniteurs de souris en l'absence d'Epo (Dolznig et al., 2002). Chez l'homme, également, il a été récemment décrit que la surexpression de Bcl-XL dans des cellules souches CD34+ induisait, comme STAT5CA, la différenciation érythroïde en l'absence d'Epo (Garcon et al., 2006). Il a de plus été décrit que Bcl-XL, en plus de son rôle principal comme facteur anti-apoptotique, interviendrait dans le processus de synthèse de l'hème et dans la différenciation érythroïde *via* la voie Raf-1 (Hafid-Medheb et al., 2003) (Haughn et al., 2003), bien que Raf-1 ait également été décrit comme favorisant la prolifération et non la différenciation (Rubiolo et al., 2006). Ces données

expérimentales témoignent d'un rôle potentiel de Bcl-x_L dans la différenciation érythroblastique, indépendamment de ses fonctions anti-apoptotiques.

Des anomalies d'expression de Bcl-x_L ont été impliquées dans la physiopathologie de la polyglobulie de Vaquez. Il a tout d'abord été observé que les érythroblastes de ces patients sont plus résistants aux stimuli apoptotiques (Pahl, 2000). Par ailleurs, une expression accrue de Bcl-x_L est observée dans les érythroblastes de ces patients (Silva et al., 1998). La surexpression de Bcl-x_L dans des cellules CD34⁺ humaines permet d'obtenir une prolifération et une différenciation érythroïde en absence d'Epo, superposable à ce qui est observé chez ces patients polyglobuliques (Garcon et al., 2006). L'effet de la surexpression de Bcl-x_L semble quand même moins important que celui de STAT5CA, pouvant laisser penser que d'autres cibles de STAT5 puissent être impliquées.

L'Epo exercerait également une partie de ses effets anti-apoptotiques indépendamment de Bcl-x_L, au moins dans les phases précoces de la maturation érythroïde terminale : l'ajout d'Epo aux cultures d'érythroblastes *bcl-x*^{-/-} permet de diminuer significativement le taux d'apoptose de ces cellules, indiquant que l'effet de l'Epo peut faire intervenir une autre protéine anti-apoptotique que Bcl-x_L (Rhodes et al., 2005b).

I.D.1.2.2.1.3.2. La voie PI3-Kinase/AKT-PKB

La voie de signalisation impliquant la PI3K participe à la réponse aux cytokines dans de nombreux systèmes cellulaires normaux ou malins (Brazil et al., 2002) (Vivanco and Sawyers, 2002). La PI3K est un hétérodimère constitué d'une sous-unité régulatrice (p85) et d'une sous-unité catalytique (p110) (Figures E6 et E8). L'Epo active la voie de signalisation PI3-kinase en recrutant la sous unité-p85, soit de façon directe par interaction entre le domaine SH2 de p85 et le résidu tyrosine cytosolique Y479 de Epo-R, soit indirectement par le biais de plusieurs protéines intermédiaires telles que Cbl, Gab1 et Gab2, IRS-2 et Vav (pour revue, cf. (Constantinescu et al., 1999)).

L'activation de la PI3K par phosphorylation induit la génération de phosphatidylinositol-triphosphate (PIP3), second messenger qui se fixe sur un domaine spécifique de la PKB ou AKT et permet son activation. En activant PI3K, l'Epo a un effet sur la progression du cycle cellulaire en augmentant l'expression des cyclines D3, E et A ainsi que la transcription et la traduction de c-kit (Sivertsen et al., 2006).

Le rôle de cette voie de signalisation dans l'érythropoïèse est souligné par plusieurs arguments expérimentaux:

- L'inhibiteur sélectif LY294002 de la voie PI3K/AKT inhibe la prolifération cellulaire et active l'apoptose de précurseurs érythroïdes (Haseyama et al., 1999). Il inhibe également la différenciation érythroïde de cellules primaires CD34⁺ *in vitro* (Myklebust et al., 2002).

- La transduction de progéniteurs murins *Epo-R*^{-/-} avec un récepteur tronqué ne comportant dans sa partie cytoplasmique que la tyrosine Y479 permet de restaurer la prolifération et la différenciation érythroïde, malgré l'absence d'activation de STAT5 (Klingmuller et al., 1997).

- L'expression d'une forme constitutivement active d'AKT permet la différenciation érythroïde des CFU-E de foie fœtal de souris sauvages et de souris *JAK2*^{-/-}, en l'absence d'Epo. Cet effet n'est pas lié à la diminution du nombre de cellules en apoptose, ni à une augmentation de la prolifération cellulaire, mais semble lié à un effet direct d'AKT sur la différenciation érythroïde. L'inhibition d'AKT par siRNA dans les progéniteurs de foie fœtal *Ter119*^{-/-} diminue le nombre de CFU-E (Ghaffari et al., 2006).

- L'invalidation de p85 est létale chez la souris (nécrose hépatique et ascite chyleuse) (Fruman et al., 2000). L'étude des embryons p85^{-/-} à 14,5 jours de vie intra-utérine révèle une diminution du nombre d'érythrocytes, ainsi qu'une diminution du nombre de CFU-E et BFU-E dans le foie fœtal (Huddleston et al., 2003).

Plusieurs effecteurs d'AKT ont été identifiés dans les cellules érythroïdes. Ils sont principalement impliqués dans l'activation des mécanismes anti-apoptotiques et dans la prolifération cellulaire, bien qu'un rôle spécifique dans la différenciation cellulaire ne puisse être exclu (Ghaffari et al., 2006) :

- Phosphorylation et inactivation de Bad: la protéine pro-apoptotique Bad, lorsqu'elle n'est pas phosphorylée, retient Bcl-XL dans le cytoplasme. Après phosphorylation par AKT, Bad libère Bcl-XL qui peut ainsi exercer ses fonctions anti-apoptotiques.

- Phosphorylation de Foxo-3a/FKHR-L1 (Brunet et al., 1999) (Kashii et al., 2000). Foxo-3a (« Forkhead box O3a ») est un facteur de transcription impliqué dans la régulation positive de gènes pro-apoptotiques tels que *FasL*, *Bim* ou de gènes de régulation du cycle cellulaire tels que *p27kip1* ou *BTG1* (« B cell Translocation Gene 1 »). Foxo-3a est exprimé dans des cellules érythroïdes mais son expression diminue progressivement pendant la maturation érythroïde. Dans des précurseurs érythroïdes immatures, Foxo-3a est rapidement phosphorylé *via* l'Epo, par AKT, puis est exporté hors du noyau et retenu par les protéines 14-3-3 dans le cytoplasme des précurseurs érythroïdes (*cf.* schéma page 141). Il ne peut donc pas réguler l'expression de ses gènes cibles. L'activation de Foxo-3a est suffisante pour déclencher l'apoptose observée lors du

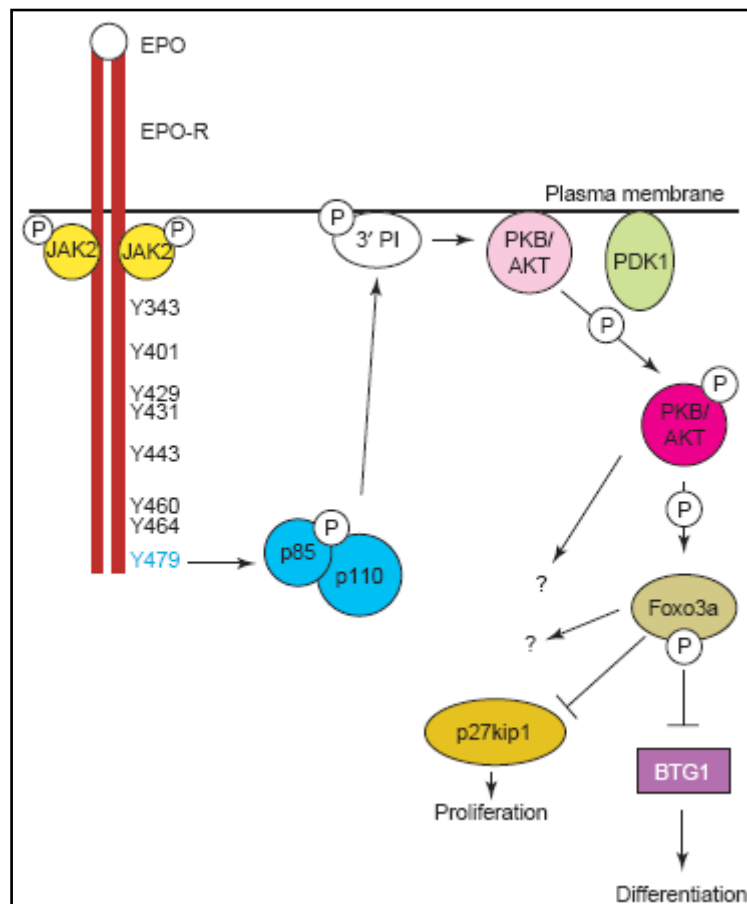


Figure E8 : Voies de transduction du signal impliquant la phosphoinositol-3 kinase induites après activation d'EpoR par la fixation d'Epo

(tiré de Richmond et al, 2005)

sevrage en Epo (Dijkers et al., 2002). La phosphorylation AKT-dépendante de Foxo-3a est donc un élément essentiel à la survie des progéniteurs érythroïdes immatures.

- Activation des facteurs de transcription NF-KB (« Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells ») et CREB permettant la régulation positive de gènes anti-apoptotiques (Djordjevic and Driscoll, 2002) (Nicholson and Anderson, 2002).

- Régulation positive de la Survivine, membre de la famille IAP (« Inhibitor of Apoptosis Protein ») qui inhibe l'apoptose en inactivant les caspases et dont le rôle essentiel dans la maturation érythroïde terminale a été récemment décrit (Leung et al., 2007).

- La GSK3 (« Glycogen Synthetase Kinase-3 ») est impliquée dans le métabolisme du glycogène et voit son activité augmenter lors de la privation en facteur de croissance, qui peut aboutir à un changement conformationnel de Bax amplifiant son activité apoptotique. La phosphorylation de la GSK3 par AKT inhibe son activité et est capable de protéger des cellules érythroïdes de l'apoptose induite par la privation en Epo (Somervaille et al., 2001).

- Phosphorylation de GATA-1. Cette phosphorylation est nécessaire à l'activation transcriptionnelle de gènes cibles de GATA-1 tel que celui codant pour la métalloprotéase TIMP-1 (Kadri et al., 2005).

I.D.1.2.2.1.3.3. La voie RAS-MAPKinase

Epo-R active la voie Ras par différents mécanismes. Soit directement par son domaine SH2, soit par le biais de la tyrosine phosphatase SHP2 ou SHC de la molécule adaptatrice Grb2 recrutée par l'Epo-R. Ce recrutement permet la translocation du facteur SOS puis l'activation de Ras. Les protéines Vav peuvent aussi jouer un rôle dans le processus d'activation de Ras.

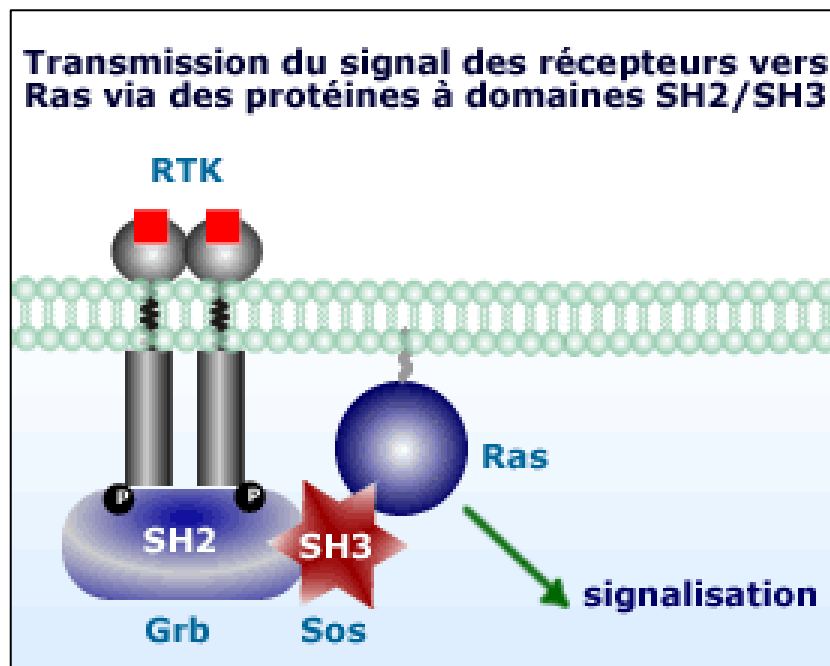


Figure E9 : Voies de transduction du signal ras-Map kinase induites après activation d'EpoR par la fixation d'Epo

(tiré de www.avernes.fr/Oncologie)

Ras active en aval une cascade de kinases qui phosphorylent et activent certains facteurs transcriptionnels (Figures E6 et E9); ceux-ci transloquent dans le noyau et régulent l'expression de leurs gènes cibles. En aval de l'activation de Ras, Raf-1 est activé et à leur tour les MAP kinases, ainsi que quelques gènes incluant c-fos, c-myc, c-jun. L'activation de Ras est essentielle dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose des précurseurs érythroïdes. Chez les mammifères, bien qu'il existe 3 protéines Ras homologues, H-Ras, N-Ras et K-Ras, seule K-Ras est essentielle pour l'érythropoïèse et particulièrement pour la différenciation des progéniteurs érythroïdes jusqu'au stade d'érythroblastes basophiles matures, ainsi que pour la prolifération de progéniteurs hématopoïétiques (Khalaf et al., 2005). L'inactivation de l'isoforme K-ras chez la souris est létale entre 12 et 14 jours de vie embryonnaire (Johnson et al., 1997) (Koera et al., 1997). Les embryons sont anémiques et le nombre de CFU-E et de BFU-E dans le foie fœtal est diminué. La maturation érythroïde terminale est retardée entre le stade basophile et le stade polychromatophile (Khalaf et al., 2005). L'Epo active ainsi en aval de Ras plusieurs MAP kinases, incluant ERK1/2, SAP kinase (« Stress-Activated Protein kinase »)/Jun kinase et p38 :

- La voie ERK (Jacobs-Helber et al., 1997). ERK1/2 est impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire dans les précurseurs érythroblastiques : il participe à l'expansion d'un compartiment de progéniteurs érythroïdes immatures, en favorisant leur prolifération au détriment de leur différenciation terminale (Sui et al., 1998). Il a été décrit que les activités de ERK1 et ERK2 pourraient au cours de l'érythropoïèse contrôler l'activité caspase et maintenir l'expression de Bcl-X_L (Mori et al., 2003).

- La voie JNK (Jacobs-Helber and Sawyer, 2004). JNK est une sérine/thréonine kinase qui active par phosphorylation la protéine Jun et lui permet d'exercer, au sein du complexe AP1, ses propriétés d'activation transcriptionnelle. AP1 est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et dans la régulation tant positive que négative de l'apoptose. Les complexes AP1, et particulièrement ceux contenant Jun-B, ont été impliqués dans l'induction de l'apoptose observée lors de la privation en facteurs de croissance. Au contraire, les complexes AP1 contenant c-jun activée ont été impliqués dans l'inhibition de l'apoptose dans des cellules dépendantes des facteurs de croissance et l'expression de c-jun retarde l'apoptose induite des cellules érythroïdes. (Xia et al., 1995) (Shimizu et al., 1996). La voie JNK est également impliquée dans la prolifération de progéniteurs érythroïdes immatures : l'inhibiteur SP600125 de JNK inhibe la

prolifération des BFU-E, mais pas celle des CFU-E ni des stades plus tardifs de l'érythropoïèse (Jacobs-Helber and Sawyer, 2004).

- La voie p38 MAPkinase (Nagata et al., 1998). La voie p38 est impliquée dans les étapes terminales de la maturation érythroïde : l'inhibiteur SB203580 inhibe la différenciation érythroïde induite par l'Epo dans les cellules érythroleucémiques SKT6, alors que l'expression d'une forme active de p38 induit la différenciation érythroïde en l'absence d'Epo (Nagata et al., 1998) (Uddin et al., 2004). p38 induit l'expression de la globine γ dans les cellules K562 et dans les progéniteurs érythroïdes primaires (Pace et al., 2003). Une activation excessive de p38 a été décrite dans les syndromes myélodysplasiques. L'utilisation d'inhibiteurs de cette voie permet de restaurer l'hématopoïèse *in vitro* chez ces patients (Navas et al., 2006) (Navas et al., 2006). A noter cependant que l'anémie observée chez les souris $p38^{-/-}$ n'est pas liée à une anomalie de l'érythropoïèse mais à un défaut de production rénale d'Epo (Tamura et al., 2000).

I.D.1.2.2.1.3.4. Les voies LYN et BTK

D'autres kinases sont associées à l'Epo-R, incluant Lyn et Btk qui peuvent jouer un rôle dans la phosphorylation d'Epo-R et la transduction du signal (Chin et al., 1998). Lyn est un substrat de la signalisation de l'Epo et joue un rôle dans la différenciation érythroïde.

Le rôle de Lyn a été décrit grâce à la lignée cellulaire érythroïde J2E-NR, qui est Lyn-déficiente et dont la différenciation érythroïde est altérée (Tilbrook et al., 1997). Les érythroblastes de souris $Lyn^{-/-}$ n'expriment ni GATA-1, ni EKLF et l'expression de STAT5A et STAT5B est diminuée. L'altération de la différenciation érythroïde et l'anémie observées sont associées à une augmentation du nombre de BFU-E et de CFU-E dans la rate (Ingley et al., 2005). L'activation de CD45 bloque la différenciation érythroïde des cellules $CD34^{+}$ de sang de cordon, en inhibant la phosphorylation de Lyn et non pas celle de JAK2 (Harashima et al., 2002). L'activation de Lyn jouerait un rôle positif à deux étapes de l'érythropoïèse : au niveau de la prolifération des progéniteurs érythroïdes et de la survie des érythroblastes lors des phases de maturation terminale (Karur et al., 2006).

La tyrosine kinase BTK, qui est nécessaire pour le développement des lymphocytes B, est aussi impliquée dans la signalisation d'Epo-R. Bien qu'aucun patient avec une agammaglobulinémie liée à l'X (déficient en BTK), ni des souris de $BTK^{-/-}$ n'aient montré une quelconque altération de l'érythropoïèse, il a été décrit, dans les progéniteurs érythroblastiques déficients en BTK, une réduction de la phosphorylation d'Epo-R et de JAK2 avec une accentuation de la différenciation érythroïde et une diminution de la capacité d'auto-renouvellement.

Le mécanisme d'action de BTK sur la signalisation d'Epo-R reste à déterminer, mais a lieu probablement en aval de l'activation de Lyn et de JAK2. De plus, BTK est impliquée dans la protection des progéniteurs et précurseurs immatures érythroïdes de la stimulation des récepteurs de mort (Schmidt et al., 2004) (cf. infra).

I.D.1.2.2.1.3.5. Régulation par l'érythropoïétine du calcium intracellulaire

L'activation d'Epo-R entraîne un afflux calcique dans les précurseurs érythroïdes au stade BFU-E mature (Miller et al., 1999a). Cette entrée massive de calcium dans la cellule nécessite la phosphorylation du résidu tyrosine Y460 intracytoplasmique d'Epo-R. Ce flux calcique fait probablement intervenir les canaux TRPC-2 et 6 (« Transient Receptor Potential Channel »), fortement exprimés dans les précurseurs érythroblastiques (Chu et al., 2004). La concentration de calcium dans les cellules érythroïdes augmente plus dans le noyau que dans le cytoplasme, après stimulation par l'Epo. Malgré des expériences préliminaires dans des lignées érythroleucémiques murines, le rôle de cet afflux calcique dans la différenciation et la prolifération des précurseurs érythroïdes reste à préciser.

I.D.2. Régulation négative de l'érythropoïèse

Bien qu'ils ne soient pas entièrement élucidés, les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la régulation positive de l'érythropoïèse sont bien caractérisés. Cependant, pour éviter une production massive d'érythrocytes et une polyglobulie, qui peut aboutir à des complications d'hyperviscosité, des mécanismes de régulation négative sont absolument nécessaires.

I.D.2.1. Régulation négative de l'érythropoïèse au niveau cellulaire

I.D.2.1.1. Stem cell factor et c-kit

Il n'existe aucune preuve claire qu'un excès de progéniteurs érythroïdes ou d'érythrocytes régule la production de SCF par les cellules stromales. Au contraire, la concentration en Epo et l'activation de l'Epo-R sont les paramètres principaux qui déterminent la production de globules rouges.

I.D.2.1.2. Production d'érythropoïétine

La production d'Epo est déterminée à deux niveaux.

- 1- Tout d'abord, la production d'Epo est bien contrôlée par l'état d'oxygénation du parenchyme rénal (cf. supra). Quand une quantité suffisante de globules rouges est produite, l'oxygénation en résultant induit la diminution de production d'Epo par le rein, *via* la dégradation de HIF

- 2- En plus de la diminution de la production d'Epo, une modulation de l'action de l'Epo a lieu après l'interaction Epo/Epo-R par l'endocytose et la dégradation d'Epo et d'Epo-R par le protéasome des progéniteurs érythroïdes (cf. infra).

Ces niveaux de régulation négative contribuent au contrôle précis de la concentration d'Epo dans le sang, permettant de prévenir une polyglobulie secondaire après la reconstitution d'une hémorragie ou d'une hémolyse.

I.D.2.1.3. Les cytokines, les récepteurs de morts et leurs ligands

Dans les processus inflammatoires diverses cytokines incluant TNF- α (« Tumor Necrosis Factor- α »), IFN- γ et TGF- β , ou des chemokines comme SDF-1 (« Stromal Derived Factor-1 ») sont anormalement synthétisées et peuvent perturber l'érythropoïèse à plusieurs niveaux (Hafid-Medheb et al., 2003). Les cytokines inflammatoires sont responsables d'une diminution de la synthèse d'Epo par le rein et le niveau d'Epo dans le sérum n'est donc pas adapté au taux d'oxygénation tissulaire. Elles diminuent également la disponibilité du fer pour les progéniteurs érythroïdes, en induisant la synthèse d'Hepcidine (pour revue cf. (Roy and Andrews, 2005). Les cytokines inflammatoires peuvent aussi avoir une action directe sur les progéniteurs érythroïdes.

Les ligands et les récepteurs à domaine de mort appartiennent à la superfamille du TNF et du récepteur au TNF (TNF-R) (cf. chapitre II). Plusieurs membres de la famille TNF/TNF-R participent au rétrocontrôle négatif de l'érythropoïèse (pour revue, cf. (Testa, 2004)). La perte de ces rétrocontrôles induit une érythrocytose chez la souris *FADD*^{-/-} (« Fas-Associated Death Domain ») ou *caspase-8*^{-/-} (Varfolomeev et al., 1998) (Yeh et al., 1998). Quatre principaux membres de la famille du TNF sont impliqués dans la régulation négative de l'érythropoïèse : TNF, TRAIL (« TNF Related Apoptosis Inducing Ligand »), Fas et TWEAK.

I.D.2.1.3.1. Régulation négative de l'érythropoïèse par Fas/FasL

Le rôle du système Fas/FasL dans la régulation négative de l'érythropoïèse est crucial (cf. II.A.2.4.1.) Le nombre de progéniteurs hématopoïétiques extra-médullaires est accru chez les souris Fas^{-/-} et FasL^{-/-} (Schneider et al., 1999). Les cellules CD34⁺ humaines sont protégées par des taux élevés de c-FLIP (« FADD-Like ICE Inhibitory Proteins ») de l'action de Fas ou d'un de ces agonistes (Kim et al., 2002). L'expression de Fas est faible dans les progéniteurs érythroïdes

immatures (Dai et al., 1998) et augmente dès les phases précoces de l'érythropoïèse entre le stade BFU-E et le stade proérythroblastique (De Maria et al., 1999a). Inversement, l'expression membranaire de FasL augmente tardivement au cours de l'érythropoïèse, à partir du stade polychromatophile (De Maria et al., 1999a). Ce FasL est fonctionnel : il active le récepteur Fas et induit l'apoptose des progéniteurs érythroïdes (De Maria et al., 1999b). Cette régulation négative implique des interactions cellulaires directes entre érythroblastes matures et immatures. La cohésion structurelle nécessaire à ces interactions est assurée *in vivo* au sein de l'îlot érythroblastique. L'apoptose induite par Fas est modulée par le taux d'Epo: lorsque le taux d'Epo est élevé, l'expression de FasL est réduite à la surface des érythroblastes polychromatophiles. Lorsque le taux d'Epo est bas, FasL est plus fortement exprimé et active Fas à la surface des proérythroblastes et des érythroblastes basophiles. Chez la souris co-exprimant Fas et FasL dans les érythroblastes immatures qui agiraient de façon autocrine, il a été montré que l'Epo diminue l'expression de Fas/FasL et l'apoptose érythroblastique (Liu et al., 2006b) (Socolovsky, 2007). Il a aussi été suggéré que l'Epo, en induisant l'expression d'une isoforme de la protéine kinase C (PKC ϵ), pourrait aussi inhiber la sensibilité des érythroblastes à l'activation des récepteurs de mort, en induisant les protéines anti-apoptotiques de la famille bcl2 (Mirandola et al., 2006). Il a récemment été mis en évidence dans la maladie de Vaquez, caractérisée par une activation dérégulée de la signalisation d'Epo-R., que la présence de la mutation de JAK2^{V617F} dans les érythroblastes est associée à une hyper-expression dérégulée de c-FLIP (« cellular FLIP ») short qui pourrait contribuer à leur résistance à l'activation de la voie Fas (Zeuner et al., 2006) (cf. II.A.2.3.1.1.1.3.2.).

L'activation de Fas déclenche la cascade d'activation des caspases à l'origine du clivage et de GATA-1 et SCL/TAL-1 et a pour conséquence le blocage de la différenciation et enfin l'apoptose (De Maria et al., 1999a) (De Maria et al., 1999b) (Zeuner et al., 2003a). L'absence d'induction de Bcl-XL, résultant du clivage de GATA-1, est probablement un des mécanismes essentiels responsables de l'apoptose des proérythroblastes et des érythroblastes basophiles. Leur sensibilité à FasL est accentuée par les cytokines qui induisent le cycle cellulaire des progéniteurs immatures incluant, le SCF, l'IL-3 et Tpo. Les mécanismes d'activation de l'apoptose par la voie intrinsèque ou extrinsèque induisent chez les sujets normaux une proportion faible mais significative d'érythropoïèse inefficace, ce qui maintient une réserve de progéniteurs érythroïdes disponible.

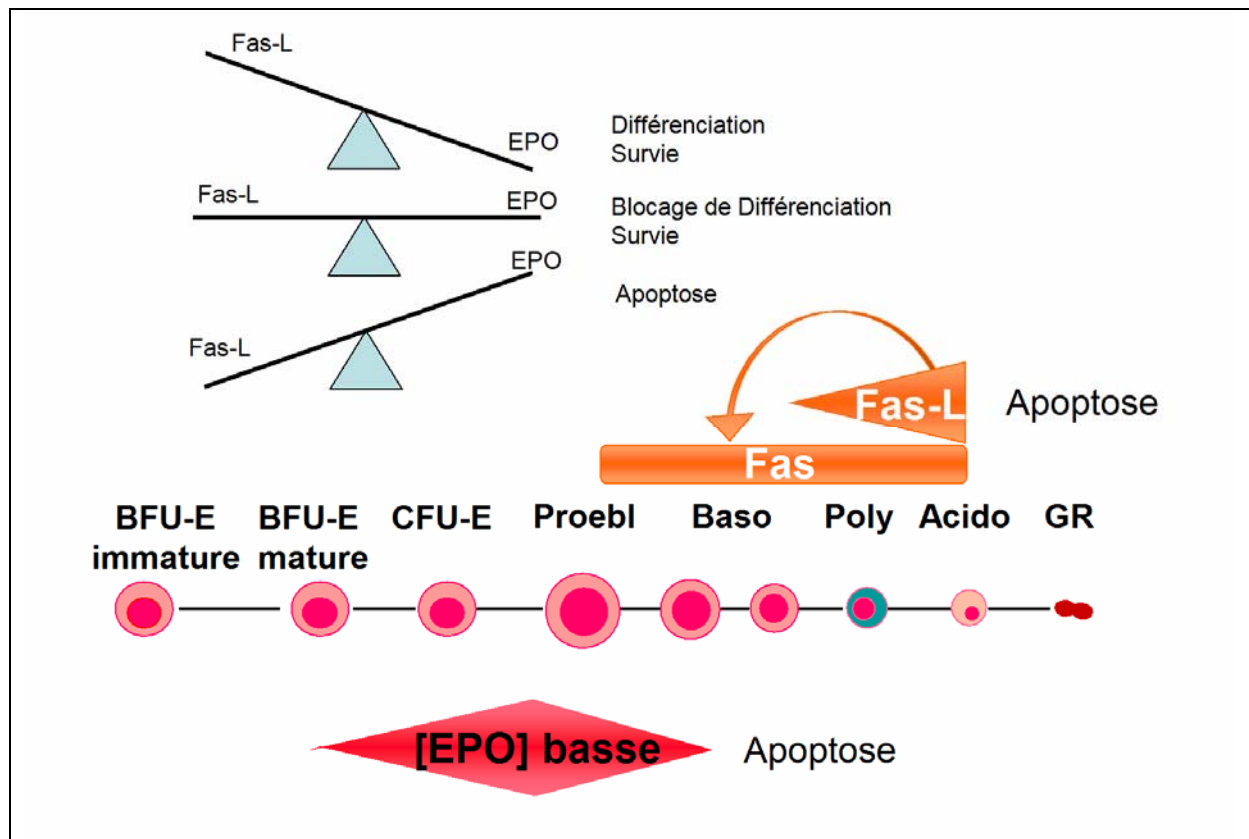


Figure E10: Régulation de l'érythropoïèse par les récepteurs de mort et le taux d'Epo

En rendant les précurseurs médullaires plus ou moins sensibles à l'apoptose, l'Epo adapte à tout moment la production de globules rouges matures aux besoins de l'organisme. Ce mécanisme de contrôle est au centre de la régulation de la production des globules rouges (Figure E10).

I.D.2.1.3.2. Rôle du TNF- α

Le TNF- α inhibe l'érythropoïèse à la fois *in vitro* et *in vivo* (Akahane et al., 1987a) (Moldawer et al., 1989) (Ulich et al., 1990). Cet effet est confirmé dans les essais cliniques : l'utilisation du TNF- α dans le traitement de certains cancers induit une diminution du taux d'hémoglobine. Inversement, les anticorps anti-TNF- α utilisés dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques améliorent l'anémie observée dans ces pathologies. Au cours des syndromes myélodysplasiques, le TNF- α participe à l'excès d'apoptose des progéniteurs érythroïdes (Kitagawa et al., 1997). Les anticorps anti-TNF- α diminuent les besoins transfusionnels de certains patients.

Le TNF- α inhibe la prolifération des proérythroblastes, augmente leur taux d'apoptose et inhibe *in vitro* la formation de colonies érythroïdes (Means et al., 1990). Il peut agir directement sur le récepteur au TNF des érythroblastes immatures et induire la synthèse de céramide. Les anticorps neutralisants, anti-TNF- α , au contraire stimulent la différenciation érythroïde de cellules CD34⁺ humaines cultivées en présence d'Epo (Xiao et al., 2002) (Jacobs-Helber et al., 2003). Les progéniteurs érythroïdes ont une expression paracrine ou autocrine de TNF- α . Les souris *TNF- α ^{-/-}* ont un nombre accru de BFU-E dans leur moelle par rapport aux souris sauvages ; l'adjonction de TNF- α dans les cultures de BFU-E des souris *TNF- α ^{-/-}* diminue le nombre de colonies (Jacobs-Helber et al., 2003).

I.D.2.1.3.3. Rôle de TRAIL

TRAIL et ses récepteurs sont impliqués dans la surveillance immunitaire anti-tumorale (Sedger et al., 2002) (Rubio-Moscardo et al., 2005) (Zerafa et al., 2005). Les interférons, dont le rôle anti-tumoral est bien connu, sont de puissants inducteurs de l'expression de TRAIL à la surface des cellules immunitaires (pour revue, cf. (Smyth et al., 2003)). TRAIL est également impliqué dans la régulation de l'érythropoïèse et de la mégacaryopoïèse : l'utilisation de fortes doses de TRAIL recombinant induit une anémie modérée (Ashkenazi et al., 1999). Les progéniteurs érythroïdes expriment à leur surface, à la fois les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (principalement sur les érythroblastes les plus immatures) et leur ligand TRAIL (principalement sur les érythroblastes les plus matures) (De Maria et al., 1999b). L'expression du système TRAIL/TRAIL-R dans

l'érythropoïèse est donc comparable à celle de Fas/FasL. Les conséquences de l'activation de TRAIL sont différentes selon la concentration d'Epo présente dans le milieu. Lorsque les taux d'Epo sont élevés, les érythroblastes résistent à l'apoptose induite par TRAIL (Zamai et al., 2000) (Secchiero et al., 2004), mais la différenciation érythroblastique est inhibée. Cette inhibition est liée à l'activation de la voie ERK1/2 (Secchiero et al., 2004). Lorsque l'Epo est présente en faible quantité, l'activation de TRAIL induit la mort cellulaire par apoptose. La relevance de ces observations *in vivo* est soulignée par plusieurs études : une expression médullaire forte de TRAIL contribue à l'anémie observée au cours de certaines hémopathies comme le myélome multiple ou les syndromes myélodysplasiques (Silvestris et al., 2002) (Campioni et al., 2005). Chez les patients atteints de myélome multiple, la thalidomide améliorerait l'anémie par diminution de l'expression de TRAIL, de TRAIL-R1 et de TRAIL-R2 (Grzasko et al., 2006). Enfin, les progéniteurs CD34⁺ de patients atteints de polyglobulie de Vaquez JAK2^{V617F} sont insensibles à l'action apoptotique de TRAIL (Zeuner et al., 2006).

I.D.2.1.3.4. TWEAK et érythropoïèse

TWEAK («Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis») est un membre de la famille TNF qui possède une expression ubiquitaire (Chicheportiche et al., 1997) (Marsters et al., 1998). TWEAK et son récepteur Fn-14 («Fibroblast growth factor-inducible 14») sont faiblement exprimés dans les précurseurs érythroblastiques. Dans les cultures d'érythroblastes, TWEAK inhibe la prolifération cellulaire et la maturation terminale au delà du stade basophile (Felli et al., 2005).

I.D.2.1.3.5. Autres cytokines inhibitrices de l'érythropoïèse : Interféron- γ et TGF- β

I.D.2.1.3.5.1. Interféron - γ

L' IFN- γ participe à de nombreux mécanismes de défense anti-infectieuse et anti-tumorale. Il exerce dans l'érythropoïèse un rôle inhibiteur sur la formation de CFU-E (Means et al., 1994) (Dai and Krantz, 1999). Une expression accrue d'IFN- γ par les cellules du micro-environnement médullaire ou par les cellules monocytaires de la moelle participe à l'anémie observée au cours des syndromes d'insuffisance médullaire, tels que l'aplasie médullaire idiopathique ou la maladie de Fanconi (Zoumbos et al., 1985) (Selleri et al., 1996) (Rathbun et al., 1997).

L'IFN- γ joue un rôle complexe dans la régulation de l'érythropoïèse. Il n'a aucun effet apoptotique isolément et peut même exercer un effet protecteur sur l'apoptose au cours de la différenciation au stade érythroblaste mature.

A l'inverse, en augmentant l'expression dans les érythroblastes basophiles de plusieurs récepteurs de mort et leur ligands, y compris Fas/Fas-L et TRAIL, aussi bien que la protéine récemment caractérisée TWEAK et son récepteur Fn14, l'IFN- γ contribue à induire indirectement l'apoptose des progéniteurs érythroïdes (Felli et al., 2005). En outre, l'IFN- γ induit la formation de céramide et le blocage de sa synthèse inhibe l'apoptose (Dallaglio et al., 1999). La régulation négative de l'érythropoïèse par l'IFN- γ est donc liée à une sensibilisation des érythroblastes immatures à l'apoptose induite par l'activation des récepteurs à domaine de mort.

I.D.2.1.3.5.2. Transforming Growth Factor Beta

Le TGF- β est un inhibiteur puissant de l'érythropoïèse. Cependant, son mécanisme d'action diffère des autres cytokines ou des ligands des récepteurs de mort. L'administration quotidienne de TGF- β à la souris génère une anémie (Miller et al., 1992). *In vitro*, le TGF- β inhibe l'érythropoïèse précoce en diminuant le nombre de BFU-E (Hino et al., 1988). Contrairement aux membres de la famille du TNF, l'effet inhibiteur du TGF- β n'est pas lié à l'induction de l'apoptose. Cependant, il accélère et augmente manifestement la différenciation érythroïde aboutissant à l'énucléation des érythroblastes même en absence de macrophages. TGF- β inhibe la prolifération cellulaire en ralentissant le cycle cellulaire des cellules érythroïdes immatures et en accélérant la maturation vers des érythroblastes acidophiles et leur énucléation. Ainsi, le TGF- β est un inhibiteur paradoxal de l'érythropoïèse, qui agit en bloquant la prolifération et en accélérant la différenciation des progéniteurs érythroïdes (Zermati et al., 2000).

I.D.2.1.3.5.3. Stromal Derived Factor-1

Le SDF-1 est produit par les cellules stromales de la moelle osseuse et les cellules hématopoïétiques expriment son récepteur CXCR4 (« CXC chemokine Receptor 4 »). Des concentrations basses de SDF-1 permettent la croissance des cellules hématopoïétiques, mais de fortes concentrations nivellent la croissance des progéniteurs érythroïdes par l'augmentation de production de FasL, ce qui a pour conséquence l'induction de l'apoptose des érythroblastes par la voie Fas/FasL (Gibellini et al., 2000). On ne connaît pas encore les facteurs qui modulent la dualité des effets de SDF-1.

I.D.2.2. Régulation négative de l'érythropoïèse au niveau moléculaire

I.D.2.2.1. Régulation négative de la phosphorylation de c-kit

La régulation négative de la signalisation de c-kit est obtenue par diverses phosphatases incluant SHP-1, SHP-2 et SHIP. SHP-1 a été décrite comme ayant la propriété d'interagir avec c-kit phosphorylé, sur une tyrosine spécifique et de le déphosphoryler, ce qui inactive ainsi toutes les voies de signalisation en aval de c-kit. SHP-2 interagit avec c-kit sur une autre tyrosine et influence l'activation de la voie MAPKinase (Munugalavadla and Kapur, 2005). c-kit est aussi une cible de la protéine adaptatrice Lnk (cf. infra), en pouvant contribuer à son inactivation (Tong et al., 2005).

I.D.2.2.2. Les voies de signalisation inhibitrices induites par l'érythropoïétine : le rétrocontrôle négatif de la signalisation de l'érythropoïétine

En plus du contrôle de la concentration en Epo pour éviter la sur-stimulation, l'effet d'Epo-R est aussi finement régulé après son activation. L'activation d'Epo-R par le ligand Epo est transitoire, les mécanismes de rétrocontrôle étant immédiatement initiés afin de réguler l'intensité de la signalisation Epo. Quatre principaux systèmes de régulation coexistent : l'internalisation de Epo-R, l'activation de phosphatases inhibitrices, l'activation de la voie SOCS de rétrocontrôle négatif du signal JAK-STAT et la voie Lnk.

I.D.2.2.2.1. La dégradation du récepteur à l'érythropoïétine

Après son activation, Epo-R est rapidement dégradé par deux systèmes protéolytiques : le premier est dépendant de la présence de JAK2 et implique l'ubiquitinylation du récepteur au niveau de son extrémité C-terminale par l'intermédiaire de la protéine Beta-Trcp (« Beta-Transducing repeat-containing Protein ») puis sa dégradation par le protéasome à la surface cellulaire. Le second met en jeu l'internalisation du couple Epo/Epo-R, indépendamment de JAK2, puis sa dégradation dans les lysosomes (Verdier et al., 2000) (Walrafen et al., 2005) (Meyer et al., 2007).

I.D.2.2.2.2. L'activation des phosphatases

En plus de sa dégradation, la phosphorylation de tyrosines en réponse à l'Epo, est transitoire et retourne à son niveau de base dans les 30 minutes après la stimulation. L'Epo-R est rapidement déphosphorylé par plusieurs systèmes impliquant des protéines SOCS et des tyrosines phosphatases. Plusieurs phosphatases ont été impliquées dans ce processus, mais SHP-1 semble jouer un rôle essentiel. SHP-1 est recrutée par son domaine SH2 sur le résidu phospho-tyrosine-C-terminal du récepteur Epo-R. Elle induit la déphosphorylation de JAK2 et l'arrêt des signaux

de prolifération cellulaire (Klingmuller et al., 1995). Plusieurs mutations germinales du gène Epo-R aboutissant à la synthèse d'un récepteur tronqué ayant perdu son extrémité C-terminale ont été décrites chez l'homme. La perte du résidu tyrosine responsable du recrutement de l'activité phosphatase induit dans ces familles une polyglobulie constitutionnelle liée à une hypersensibilité des progéniteurs érythroïdes à l'Epo (pour revue, cf. (Gordeuk et al., 2005)).

I.D.2.2.2.3. Les protéines de la famille SOCS

En plus des phosphatases, la famille des régulateurs négatifs de la signalisation des cytokines SOCS est aussi impliquée dans le contrôle de l'activation d'Epo-R (Sasaki et al., 2000). L'expression des gènes SOCS est rapidement modulée en réponse à différentes cytokines et la famille SOCS agit *via* une boucle de rétrocontrôle pour supprimer la transduction du signal induite par les cytokines. Cette famille est constituée de 8 membres caractérisés par la présence en C-terminal d'un domaine SH2 suivi d'une «boîte SOCS » permettant la fixation sur les résidus tyrosines et l'inhibition de la transduction du signal de nombreuses cytokines.

L'activation de la voie STAT5 dans les progéniteurs érythroïdes est régulée par ce système de rétrocontrôle négatif. Ce sont des gènes de réponse rapide aux stimulations cytokiniques (Starr et al., 1997). Trois membres de cette famille ont été impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse : Cis, SOCS-1 et SOCS-3. Ces trois protéines sont exprimées dans les cellules érythroïdes après activation du récepteur Epo-R par son ligand (Starr et al., 1997) (Pircher et al., 2001). Les gènes SOCS sont régulés de façon différente dans des cellules érythroïdes selon le stade de maturation et peuvent induire une régulation complexe. Cis se lie aux résidus phospho-tyrosines d'Epo-R et bloque *in vitro* la signalisation Epo, mais les souris *Cis*^{-/-} ne présentent aucune anomalie de leur érythropoïèse (Marine et al., 1999). SOCS-1 et SOCS-3 partagent la propriété de se lier à JAK2 sur son domaine kinase et inhibent ainsi son activation (Sasaki et al., 1999) (Yasukawa et al., 2000) (Les souris *SOCS-1*^{-/-} meurent prématurément et présentent de nombreuses anomalies de développement avec, au premier plan, un défaut de maturation lymphoïde (Naka et al., 1998). Elles présentent une anémie modérée avec excès de précurseurs érythroïdes dans la rate (Alexander et al., 1999) (Metcalf et al., 1999). Ces précurseurs érythroïdes ont une sensibilité accrue à l'Epo (Sarna et al., 2003). SOCS-3 est la protéine de cette famille la plus importante dans l'érythropoïèse. Elle joue un rôle crucial dans l'hématopoïèse fœtale. Elle est fortement exprimée dans le foie fœtal de souris. Cette expression n'est pas sous la dépendance d'Epo, puisqu'elle est normale dans les précurseurs de foie fœtal de souris *STAT5*^{-/-}, *Epo-R*^{-/-} ou *Epo*^{-/-}. Les souris transgéniques surexprimant SOCS-3 meurent *in utero* par absence d'érythropoïèse définitive dans

le foie fœtal. L'invalidation de *SOCS-3* est létale, les embryons développant une érythrocytose majeure. Le nombre de BFU-E et CFU-E du foie fœtal chute mais ces colonies sont 5 à 10 fois plus grosses que celles des souris sauvages. La fonction de *SOCS-3* est moins cruciale dans l'érythropoïèse adulte, les progéniteurs *SOCS-3*^{-/-} reconstituant normalement l'érythropoïèse de souris irradiées (Marine et al., 1999).

I.D.2.2.2.4. La protéine adaptatrice LNK et la modulation de l'activation du récepteur à l'érythropoïétine

Les réseaux de transduction du signal des récepteurs de cytokines impliquent de façon importante des protéines adaptatrices et peuvent jouer un rôle crucial dans le contrôle de l'activation des récepteurs et leur seuil de sensibilité à l'Epo. Lnk appartient à une famille de protéines adaptatrices récemment décrites et est impliquée dans la régulation érythroïde. Les membres de cette famille de protéines sont dépourvus de fonction tyrosine kinase intrinsèque mais capables d'interagir avec leurs protéines cibles par le biais de leurs domaines PH (Pleckstrine Homologue) et SH2 (Rudd, 2001). Lnk exerce un rétrocontrôle négatif sur la signalisation de plusieurs récepteurs cytokiniques tels que c-kit, c-mpl (récepteur à la Tpo) et Epo-R.

Lnk est phosphorylé sur une tyrosine après l'administration d'Epo et inhibe la phosphorylation d'Epo-R induite par l'Epo et l'activation de JAK2, ainsi que les voies d'aval incluant STAT5, AKT et MAPK. Le domaine SH2 de Lnk est essentiel pour sa fonction inhibitrice. Cependant, son mécanisme d'action reste à élucider. Lnk peut perturber la fixation des régulateurs positifs de JAK2 et recruter d'autres inhibiteurs de JAK2, comme les protéines SOCS ou SHP-1. Finalement, la fixation de Lnk à JAK2 peut induire un changement conformationnel qui maintient JAK2 dans un état « kinase-inactif ». La surexpression de Lnk dans les cultures d'AGM (Aorte-Gonade-Mésonephro) inhibe l'apparition de progéniteurs hématopoïétiques CD45⁺ *via* l'inhibition de la signalisation SCF/c-kit (Nobuhisa et al., 2003). Les souris *Lnk*^{-/-} présentent une expansion de leur compartiment B immature ainsi qu'une hypersensibilité des progéniteurs mégacaryocytaires à la Tpo et des précurseurs érythroïdes à l'Epo (Tong and Lodish, 2004) (Tong et al., 2005). L'hématocrite des souris *Lnk*^{-/-} est normale, mais le nombre de CFU-E est augmenté dans la rate et leur réponse à l'érythropoïèse de stress est plus importante (Velazquez et al., 2002). *In vitro*, les progéniteurs CFU-E sont hypersensibles à l'Epo avec une accentuation de la phosphorylation d'Epo-R, de l'activation de JAK2 et des voies de transduction du signal induites par l'Epo, incluant STAT5, AKT et MAPK. A l'inverse la surexpression de Lnk dans les cellules érythroïdes primaires induit une apoptose massive et inhibe la différenciation terminale induite par l'Epo (Tong et al., 2005).

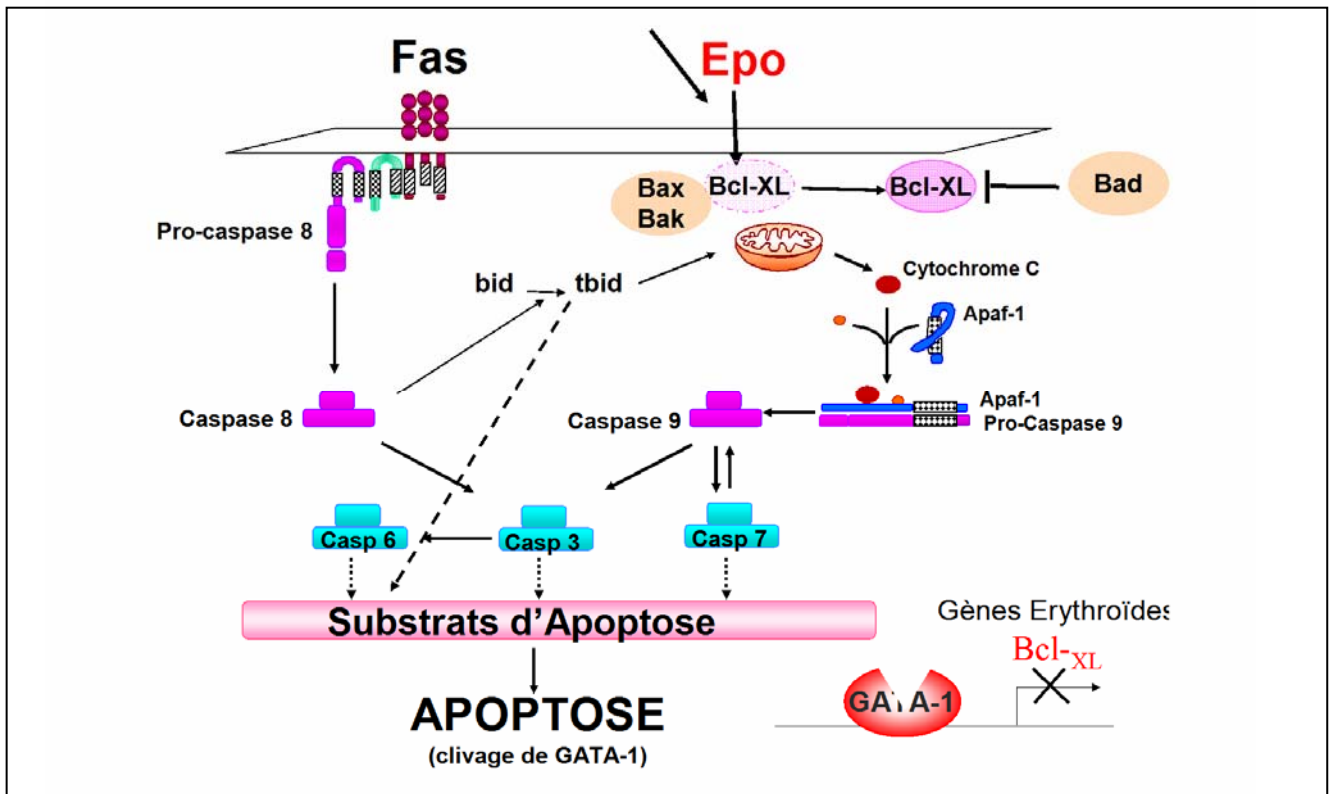


Figure E11 : Mécanismes d'activation des caspases en l'absence d'Epo, ou en présence de Fas

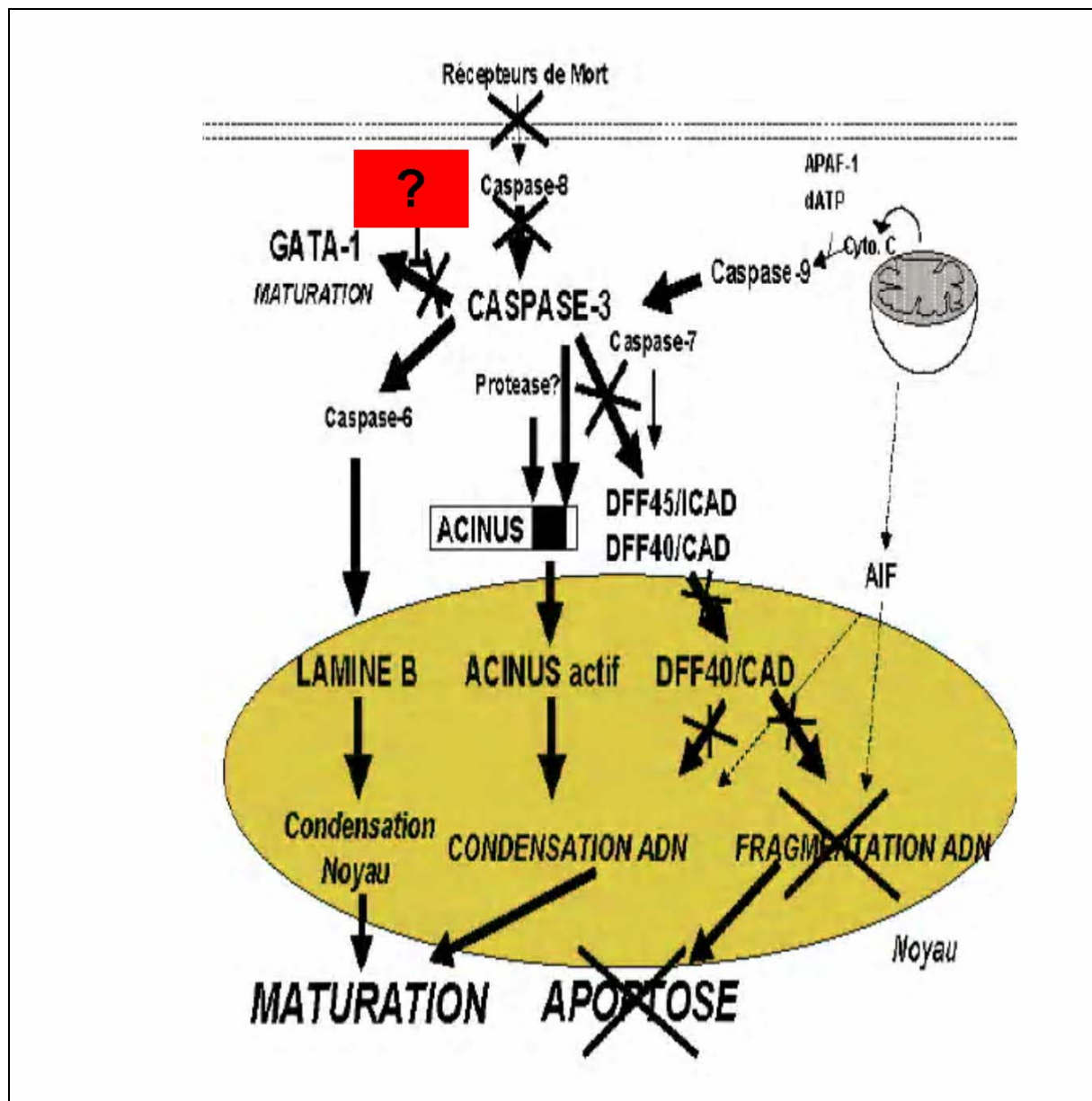


Figure E12 : Rôle des caspases dans la maturation des érythroblastes

L'absence de clivage de GATA-1 détermine le devenir de l'érythroblaste entre maturation et apoptose

I.D.2.3. Régulation moléculaire de l'érythropoïèse par l'apoptose

Au cours de l'érythropoïèse, toutes les cellules érythroïdes ne vont pas au bout de leur processus de différenciation ; les érythroblastes immatures étant particulièrement sensibles à l'apoptose. Les érythroblastes ont un seuil de sensibilité variable à l'Epo. A l'état basal, la concentration d'Epo est basse et permet seulement la maturation des érythroblastes les plus sensibles. Les autres érythroblastes se trouvent en situation de privation « relative » en Epo, ce qui induit l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Par ailleurs, au sein de l'îlot érythroblastique médullaire, les érythroblastes matures expriment FasL et TRAIL qui interagissent avec leurs récepteurs à la surface des érythroblastes immatures et qui activent les caspases exécutrices par la voie extrinsèque et pour aboutir à la protéolyse de GATA-1. Le clivage de GATA-1 induit l'arrêt de l'expression des gènes nécessaires à la maturation cellulaire et de Bcl-x_L, ce qui a comme conséquence un blocage de la différenciation érythroïde au stade d'érythroblaste basophile et enfin l'apoptose (De Maria et al., 1999b). En outre, la caspase-3 protéolyse Bcl-x_L. Dans les érythroblastes, la réponse à l'activation de Fas est diminuée par l'Epo et probablement par Bcl-X_L (De Maria et al., 1999a) (Figure E11).

Les caspases sont donc les enzymes clés de la régulation négative de l'érythropoïèse.

Le contrôle de la production des érythrocytes matures peut être résumé ainsi (Figure E10) :

- A faible dose d'Epo, les cellules meurent par apoptose,
- A dose intermédiaire les cellules sont bloquées dans leur maturation ou dans leur apoptose selon le taux d'érythroblastes matures présents dans la moelle osseuse,
- A haute dose d'Epo les progéniteurs et précurseurs érythroïdes poursuivent leur maturation indépendamment du nombre de précurseurs érythroïdes matures.

Ce modèle permet de prévenir une apoptose massive des précurseurs érythroïdes lors de l'érythropoïèse en situation normale et, en revanche, permet la production d'érythrocytes pendant l'érythropoïèse dite « de stress » après une hémolyse ou une hémorragie. (Figure E10).

I.E. Rôle des caspases dans la différenciation érythroïde terminale

Les caspases participent à la régulation de l'érythropoïèse de deux façons : d'une part, elles permettent de diminuer la production médullaire d'érythrocytes lorsque le taux d'Epo est bas, et d'autre part, comme dans d'autres systèmes de différenciation avec ou sans énucléation, les caspases peuvent aussi jouer un rôle dans la maturation des précurseurs érythroïdes (Launay et al., 2005) (cf. chapitre II.A.4.1.1.1.).

Une activation transitoire et spontanée, principalement de la caspase-3, survient entre le stade proérythroblastique et le stade basophile (Zermati et al., 2001). Cette activation induit le clivage de protéines impliquées dans l'intégrité du noyau (comme la Lamine B) ou la condensation chromatinienne sans induire la mort cellulaire (Carlile et al., 2004) et implique probablement la voie mitochondriale de l'apoptose (Figure E12). La kinase Raf-1 bloque cette activation et empêche ainsi une différenciation terminale prématurée des progéniteurs immatures en phase de prolifération (Kolbus et al., 2002). L'inhibition de cette activation transitoire des caspases (par la surexpression de Raf-1 ou par l'inhibiteur chimique z-vad) bloque la différenciation érythroïde au-delà du stade basophile chez l'Homme et chez la Souris (Zermati et al., 2001) (Kolbus et al., 2002). Le rôle des caspases au cours des phénomènes de différenciation cellulaire et en particulier lors de l'érythropoïèse, est développé dans le chapitre suivant (cf. chapitre II.A.4.1).

L'activation physiologique des caspases au cours de la différenciation érythroïde terminale présente une différence fondamentale par rapport à l'activation des caspases observées lors des stimuli apoptotiques : elle n'entraîne pas le clivage de GATA-1. Le but de ce travail de thèse a été de chercher à comprendre par quels mécanismes GATA-1 est protégé de la caspase-3 activée lors de la différenciation érythroïde terminale.

II. L'APOPTOSE

II.A. Généralités sur l'apoptose

Trois types distincts de mort cellulaire peuvent être définis : à savoir l'apoptose, la nécrose et l'autophagie. Le type de mort cellulaire peut être défini selon :

- l'apparence morphologique : apoptotique, nécrotique, ou autophagique,
- des critères enzymologiques : participation ou non de nucléases ou de différentes classes de protéases, comme les caspases, les calpaïnes, les cathepsines...,
- des aspects fonctionnels : programmé ou accidentel, physiologique ou pathologique.

II.A.1. Définition

L'apoptose est un processus actif et physiologique de mort cellulaire, utilisé pour éliminer les cellules en excès, endommagées ou infectées, potentiellement dangereuses pour l'organisme. Ce programme de mort est intrinsèque à la cellule elle-même. L'apoptose joue un rôle essentiel dans le développement normal de l'organisme et dans le maintien de l'homéostasie cellulaire chez l'adulte, de façon opposée à la mitose. La mort cellulaire «normale» a d'abord été observée durant la métamorphose des amphibiens, puis dans plusieurs tissus en développement, tant chez les invertébrés que chez les vertébrés (Weber, 1964) (Lockshin and Zakeri, 2001). En 1972, Kerr *et al.* ont décrit une mort cellulaire du même type dans divers tissus et types cellulaires : ces cellules présentaient des caractéristiques morphologiques communes, mais cependant distinctes de celles observées dans les cellules en nécrose (Kerr et al., 1972). Ces auteurs ont suggéré que ces caractéristiques morphologiques communes pouvaient être le résultat d'un programme endogène sous-jacent de mort cellulaire, qu'ils ont appelé « apoptose » (Figure C1). Ce terme vient du grec et fait allusion à la chute des feuilles en automne.

La compréhension des mécanismes impliqués dans le processus d'apoptose dans les cellules de mammifères découle de l'étude de la mort cellulaire programmée qui a lieu au cours du développement du nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Horvitz, 1999). L'apoptose a depuis été reconnue et acceptée comme un mode distinct et majeur de mort cellulaire "programmée", génétiquement déterminée. Cependant, il est important de noter que d'autres formes de mort cellulaire programmée ont été décrites et que d'autres sont peut être à découvrir (Formigli et al., 2000) (Sperandio et al., 2000) (Debnath et al., 2005). L'apoptose est un phénomène conservé à travers les espèces, elle est retrouvée dans tous les organismes multicellulaires (Steller, 1995) (Cikala et al., 1999).

II.A.2. Description de l'apoptose

II.A.2.1. Caractéristiques morphologiques

Une cellule en apoptose active une série d'évènements moléculaires et biochimiques conduisant à des altérations morphologiques. Ces changements morphologiques sont spécifiques de l'apoptose et permettent d'identifier ce type de mort cellulaire. Un des premiers changements observables est la réduction du volume cellulaire : la cellule se déshydrate et cette perte d'eau intracellulaire conduit à la condensation du cytoplasme qui aboutit à une modification de la forme et de la taille de la cellule (Figure C2). Au cours de cette étape, la cellule perd le contact avec ses voisines. Malgré la rétraction cellulaire progressive, les organites intracellulaires restent intacts et gardent leur aspect normal jusqu'à la phase terminale de l'apoptose.

Le noyau présente lui aussi des modifications : on assiste à une condensation de la chromatine qui débute à la périphérie de la membrane nucléaire (Figure C3). Puis, cette enveloppe nucléaire se désintègre et la chromatine se fragmente en petites masses distinctes.

Après cette phase de condensation, la cellule présente à sa surface des vésicules renfermant des amas de chromatine et des fragments cytoplasmiques, entourés de membrane plasmique (Figure C2). Ces vésicules vont se détacher de la cellule pour former les corps apoptotiques qui sont libérés dans le milieu. Ces corps apoptotiques sont rapidement phagocytés *in vivo*, par les cellules voisines ou les macrophages, sans provoquer d'inflammation dans les tissus environnants (Figure C1). En effet, la formation de corps apoptotiques entourés d'une membrane plasmique intacte prévient le relargage des constituants intracellulaires et donc la réaction inflammatoire.

II.A.2.2. Distinguer l'apoptose de la nécrose

Des caractéristiques morphologiques permettent de différencier l'apoptose de la nécrose, qui aboutit à un éclatement de la cellule (Figure C2) (Ziegler and Groscurth, 2004). Pendant longtemps, la nécrose a simplement été considérée comme une forme de mort cellulaire non contrôlée et accidentelle qui a lieu lorsque la cellule a subi des dommages importants. Cependant, il a été montré que l'exécution de la mort cellulaire par nécrose peut être finement régulée par des voies de transduction du signal et des mécanismes cataboliques (Golstein and Kroemer, 2007) (Festjens et al., 2006). La mort par nécrose est un phénomène passif et catabolique caractérisé par une perméabilisation membranaire précoce et un gonflement de la cellule, suivi par la rupture de la membrane plasmique. Les constituants cytoplasmiques sont alors déversés dans le milieu extracellulaire où ils sont à l'origine d'une réaction inflammatoire.

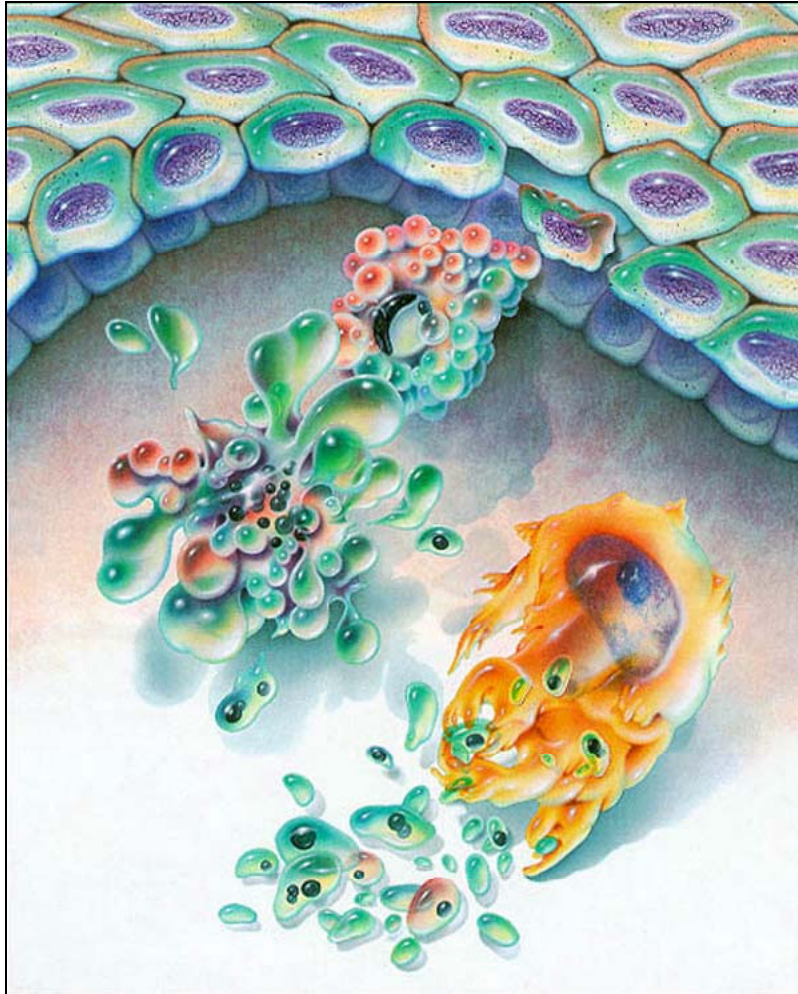


Figure C1 : Une cellule mourant par apoptose

(Tiré de NASA 2004 (www.mainsgate.com/spacebio))

La cellule se contracte et se détache de ses voisines. Des vésicules ou « blebs » apparaissent à sa surface et la chromatine se condense dans le noyau. Très rapidement, la cellule se fragmente en corps apoptotiques qui vont être ingérés par les cellules environnantes.

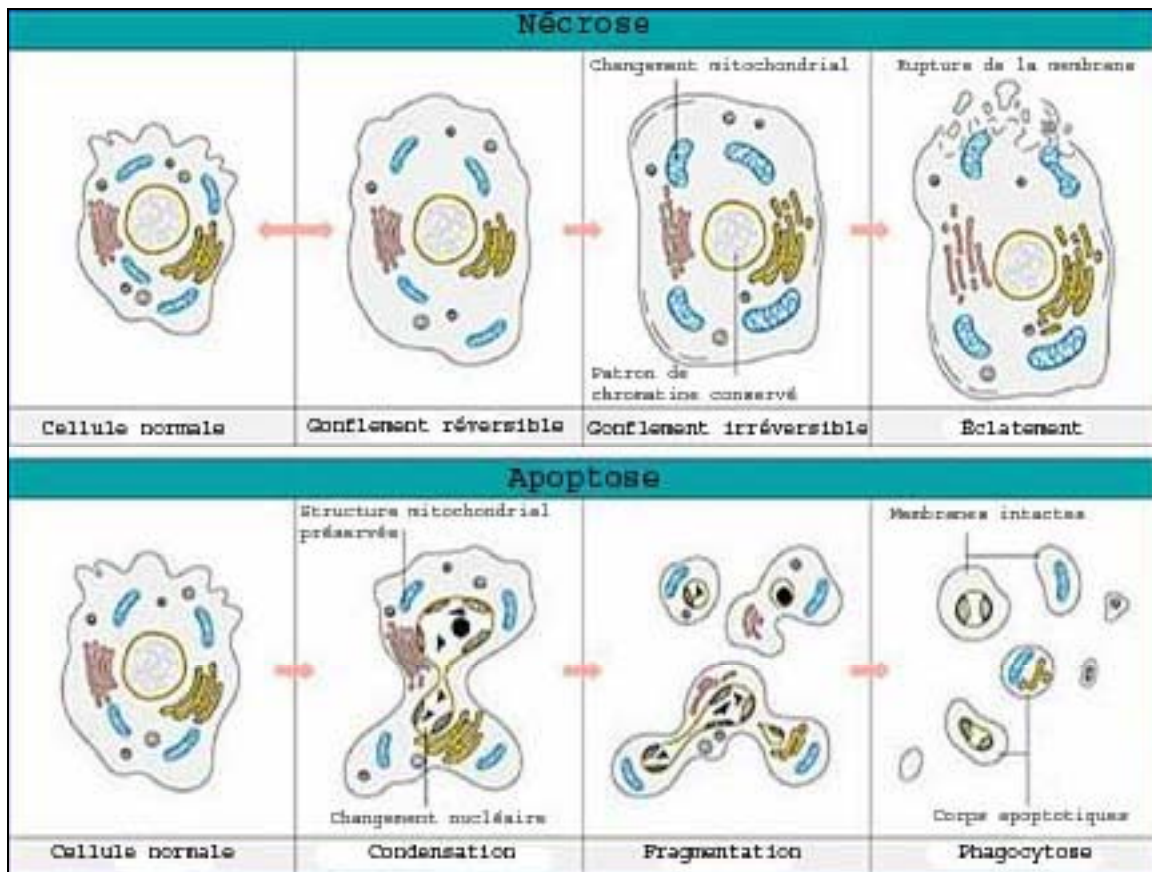


Figure C2 : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose

La nécrose se caractérise par le gonflement de la cellule jusqu'à son éclatement alors que l'apoptose se définit par une condensation de la cellule, une fragmentation du noyau et la formation de corps apoptotiques.

Contrairement à l'apoptose, au cours de la nécrose, la chromatine n'est pas fragmentée mais lysée (karyolysis). De plus, les organites cellulaires sont détruits. En absence d'un dénominateur biochimique commun, la mort cellulaire par nécrose est toujours en grande partie identifiée par des signes négatifs avec l'absence de marqueurs d'apoptose ou d'autophagie, en particulier quand les cellules subissent une perméabilisation précoce de la membrane cellulaire. Bien que les mécanismes et les aspects morphologiques de l'apoptose et de la nécrose diffèrent, dans certaines situations il peut parfois être observé un chevauchement de ces deux processus (Elmore, 2007) (Kroemer et al., 2009).

II.A.2.3. Mécanismes de l'apoptose

Les mécanismes de l'apoptose sont très complexes et sophistiqués, impliquant une cascade d'événements moléculaires (Figure C4). Jusqu'à présent, deux voies principales de l'apoptose ont été décrites : la voie extrinsèque ou dite des récepteurs de mort et la voie intrinsèque ou mitochondriale. Cependant, les deux voies sont liées et des molécules d'une voie peuvent influencer l'autre voie (Igney and Krammer, 2002). Lors de l'induction de l'apoptose par la voie des récepteurs de mort, des altérations mitochondriales sont obtenues après le clivage de Bid par la caspase-8 (Li et al., 1998) (Esposti, 2002). Ceci est un exemple de "croisement" entre les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose (Igney and Krammer, 2002) (cf. infra). Il existe une voie supplémentaire qui met en jeu la cytotoxicité induite par les lymphocytes T : la mort cellulaire par le système perforine-granzyme. Les voies extrinsèque, intrinsèque et du granzyme B convergent à terme vers la même voie exécutrice. Cette voie exécutrice est amorcée par le clivage de la caspase-3 qui aboutit à la fragmentation de l'ADN, la dégradation du cytosquelette et des protéines nucléaires, la formation de corps apoptotiques, l'expression de ligands reconnus par les récepteurs des cellules phagocytaires et finalement l'ingestion de la cellule apoptotique par ces dernières.

II.A.2.3.1. Caractéristiques biochimiques

Les changements morphologiques survenant lors de l'apoptose sont accompagnés de plusieurs modifications biochimiques spécifiques comme le clivage de protéines, la fragmentation de l'ADN et enfin la reconnaissance des cellules apoptotiques par les cellules phagocytaires. Les caspases sont largement exprimées sous forme de pro-enzyme inactive dans la plupart des cellules mais une fois activées elles peuvent souvent activer d'autres pro-caspases, permettant d'initier une cascade de protéases.

La fragmentation de l'ADN survient lors de la condensation de la chromatine. Les fragments d'ADN réguliers, générés au cours de l'apoptose, résultent de l'activation de l'endonuclease CAD/DFF40 qui clive l'ADN entre les nucléosomes. Les résultats d'électrophorèse obtenus montrent plusieurs bandes, de taille équivalente à des multiples de 180 à 200 paires de bases, qui forment une sorte de « barreaux d'échelle » d'ADN appelée « DNA ladder » (Bortner et al., 1995) (Figure C3). Ce profil n'est pas retrouvé lors de la nécrose où la dégradation de l'ADN est moins importante et aboutit à des fragments de tailles hétérogènes. (cf. infra)

D'un point de vue biochimique, l'apoptose est aussi caractérisée par la perte de l'asymétrie des phospholipides de la membrane plasmique. Les phosphatidylsérines, phospholipides anioniques présents uniquement dans le feuillet interne de la membrane des cellules « vivantes », vont se déplacer vers le feuillet externe et être externalisés à la surface des cellules apoptotiques (Bratton et al., 1997). Ceci permet à ces cellules apoptotiques d'être reconnues comme cibles par les macrophages pour la phagocytose (Fadok et al., 2001). De plus, lors de l'apoptose, certaines protéines intracellulaires sont dégradées, ce qui conduit à une altération du cytosquelette et à une vésiculation membranaire (cf. infra)

II.A.2.3.1.1. Les principaux effecteurs de l'apoptose

Les caractéristiques biochimiques et morphologiques de l'apoptose résultent de l'activation de mécanismes cellulaires complexes. L'analyse génétique des cellules de *C. elegans* a permis de mettre en évidence trois gènes clés impliqués dans la régulation de la mort cellulaire programmée : *ced-3*, *ced-4* et *ced-9*, (*ced* pour *C. elegans death*) (Hengartner and Horvitz, 1994b). Les produits des gènes *ced-3* et *ced-4* sont requis pour le déroulement de l'apoptose, la protéine CED-3 étant une protéase et la protéine CED-4 une molécule pro-apoptotique pouvant se lier à CED-3. En revanche, la protéine codée par *ced-9* a une fonction antagoniste à CED-3 et CED-4 et inhibe l'apoptose. Des homologues de ces gènes, ayant des rôles similaires dans la régulation de l'apoptose, ont été découverts chez les mammifères (Figure C5). Ainsi, l'enzyme de conversion de l'interleukine-1 β (ICE) des mammifères présente des homologies avec CED-3 et sa surexpression est capable d'induire l'apoptose dans les cellules de mammifères (Yuan et al., 1993b). Bien qu'elle ne semble pas jouer de rôle primordial dans l'apoptose et qu'elle soit plutôt impliquée dans le déroulement du processus inflammatoire, la protéine ICE a permis l'identification d'une famille de protéases à cystéine, les caspases : protéases qui sont responsables de l'exécution du processus apoptotique chez les mammifères. De même, les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, homologues de CED-9, sont des régulateurs de

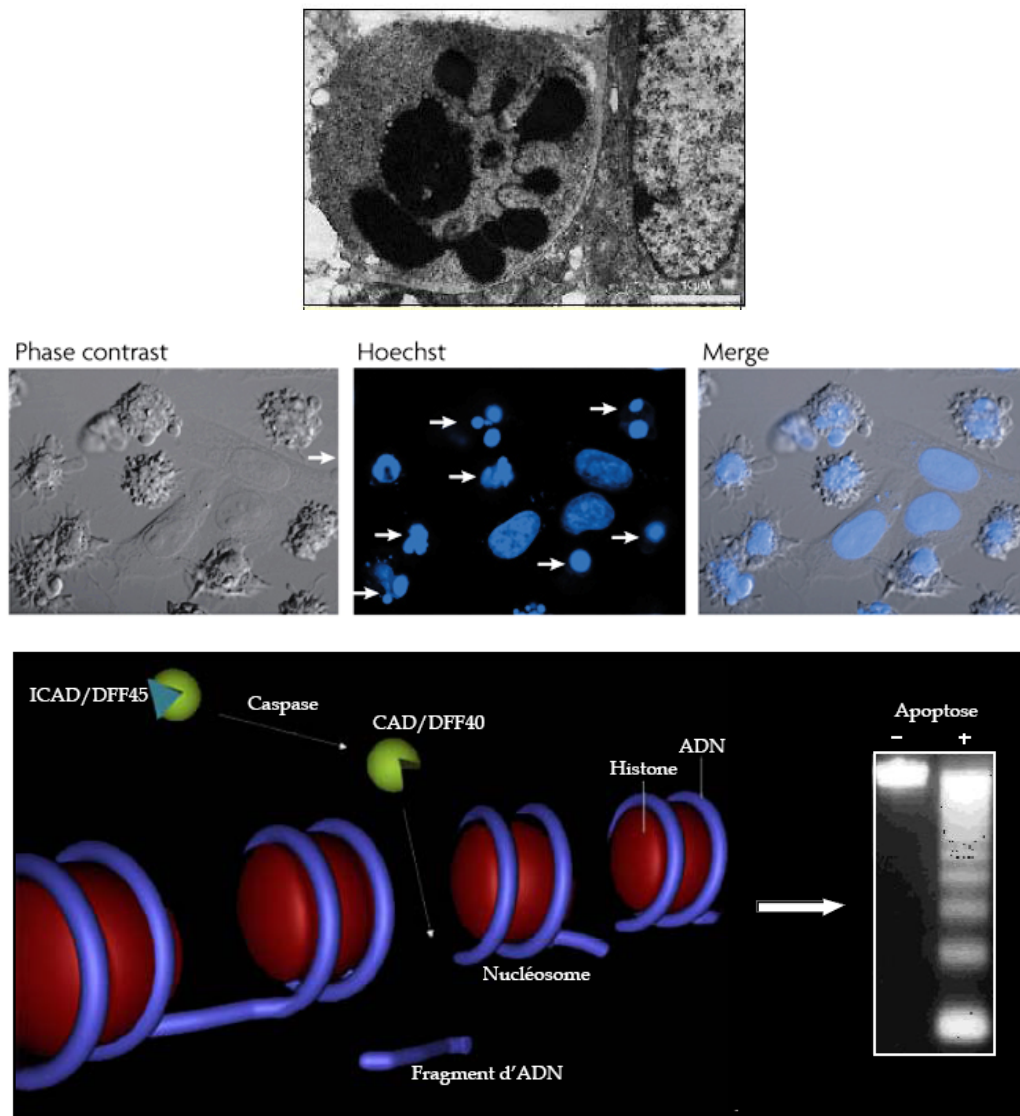


Figure C3 : La condensation de l'ADN est spécifique de l'apoptose

L'endonucléase CAD/DFF40 clive l'ADN entre les nucléosomes et génère des fragments réguliers qui forment une « échelle » d'ADN.

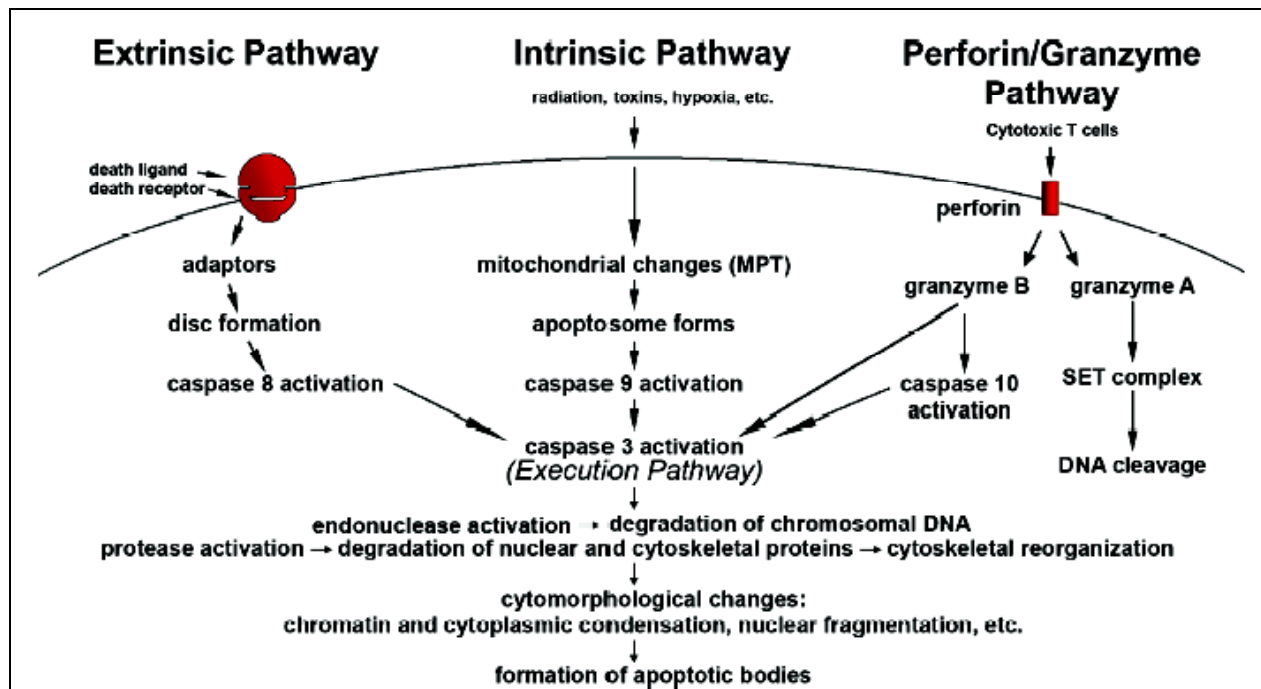


Figure C4 : Représentation schématique des évènements conduisant à l'apoptose

(Tiré de Elmore et al , 2007)

Les deux voies principales de l'apoptose sont la voie intrinsèque et la voie extrinsèque, en plus de la voie perforine/granzyme. Chacune requiert des signaux spécifiques pour induire une cascade d'évènements moléculaires, activant sa propre caspase initiatrice (8, 9, 10), qui à son tour va activer la caspase exécutive caspase-3. L'apoptose est caractérisée par des spécificités morphologiques de la cellule, incluant la contraction de la cellule, la condensation de la chromatine, la formation de corps apoptotiques qui seront phagocytés par les cellules parenchymateuse adjacentes, et les macrophages.

l'apoptose, ainsi que la protéine adaptatrice Apaf-1 (« Apoptotic Protease Activating Factor-1 »), homologue de CED-4, qui intervient dans l'activation des caspases (Hengartner and Horvitz, 1994a) (Zou et al., 1997).

II.A.2.3.1.1.1. Les caspases

Les caspases sont les composants essentiels de la plupart des voies conduisant à la mort de la cellule par apoptose. Elles sont présentes constitutivement dans les cellules et sont hautement conservées dans les espèces (Boyce et al., 2004). A ce jour, 15 caspases ont été identifiées chez les mammifères (Merops : the peptidase data : <http://merops.danger.ac.uk>). Parmi celles-ci, les caspases-1 à -10 ainsi que la caspase-14, ont été mises en évidence chez l'Homme. Toutes ces caspases présentent des similarités au niveau de leur séquence, de leur structure et de leur spécificité de substrat.

II.A.2.3.1.1.1.1. Structure quaternaire des caspases

Toutes les caspases existent dans la cellule en tant que pro-formes latentes inactives comme précurseur zymogène. Les études de structure par cristallographie et les études de séquençages peptidiques ont démontré que les caspases sont synthétisées sous forme de pro-enzymes inactives de 32-55 kDa composées de trois domaines : un grand domaine central de 17-21 kDa (p20) qui contient une grande sous-unité catalytique, un petit domaine C-terminal de 10-13 kDa (p10) aussi appelé petite sous-unité catalytique, et en N-terminal un prodomaine de 3-24 kDa appelé « death domain » (DD) (Figure C6). Dans un certain nombre de pro-caspases, les sous-unités p20 et p10 sont séparées par une petite séquence intermédiaire. Le grand prodomaine en N-terminal des pro-caspases contient des motifs structuraux de 80-100 résidus appelés superfamille des « death domain », et impliqués dans la transduction des signaux apoptotiques (Martinon et al., 2001) (Weber and Vincenz, 2001). Le DD comporte un des deux sous-domaines suivants : le « death effector domain » (DED) ou le « caspase-recruitment domain » (CARD) qui jouent un rôle critique dans l'activation des caspases (Fesik, 2000).

Sur la base de la structure de leur prodomaine et de leurs fonctions, la famille des gènes des caspases comprend 15 membres chez les mammifères (Alnemri et al., 1996) (Deveraux and Reed, 1999). Sur la base de l'analyse phylogénétique cette famille comprend deux sous-familles majeures qui sont associées soit à ICE (caspase-1) soit à des homologues de CED-3 (Chowdhury et al., 2008).

De nouvelles subdivisions des caspases sont faites selon la taille de leur prodomaine et leurs fonctions. Selon ces caractéristiques, les caspases des mammifères sont classées en 3 groupes (Figure C7) : - Les caspases avec un grand prodomaine (caspases-1, -4, -5, -12, -13 et -14) qui jouent un rôle dans la maturation des cytokines et la réponse inflammatoire sont appelés caspases inflammatoires ou caspases du groupe-I (Deveraux et al., 1998). - Le deuxième groupe comprend les caspases possédant un long prodomaine (supérieur à 90 acides aminés) avec soit un domaine DED (caspases -8 et -10), soit un domaine CARD (caspases -2 et -9) et sont appelées caspases initiatrices ou caspases du groupe-II. Les caspases qui ont un prodomaine court (20-30 acides aminés) sont appelées les caspases exécutrices (caspases-3, -6 et -7) ou caspases du groupe-III (Deveraux et al., 1997) (Roy et al., 1997) (Xu et al., 2001). Les pro-caspases-8 et -10 possèdent 2 domaines DED en tandem dans leur prodomaine (Muzio et al., 1996) (Sprick et al., 2002). Le domaine CARD est retrouvé dans les pro-caspases -1,-2,-4,-5,-9,-11 et -12 (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004) (Lamkanfi et al., 2005). Ces domaines DED et CARD permettent le recrutement des caspases initiatrices et l'interaction avec d'autres protéines dans des complexes qui aboutissent à l'auto-activation protéolytique des caspases et par suite au processus inflammatoire ou apoptotique. Une fois activées, les caspases initiatrices vont à leur tour activer les caspases effectrices qui clivent un certain nombre de protéines dans la cellule. Ainsi, les caspases initiatrices font la liaison entre les signaux déclencheurs de l'apoptose et la phase d'exécution, assurée par les caspases effectrices. Les caspases effectrices peuvent aussi activer d'autres caspases, grâce à des systèmes de régulation rétroactifs (Van de Craen et al., 1999). Cette cascade protéolytique, dans laquelle une caspase peut activer d'autre caspases, amplifie la voie de signalisation de l'apoptose et aboutit ainsi à une mort cellulaire rapide.

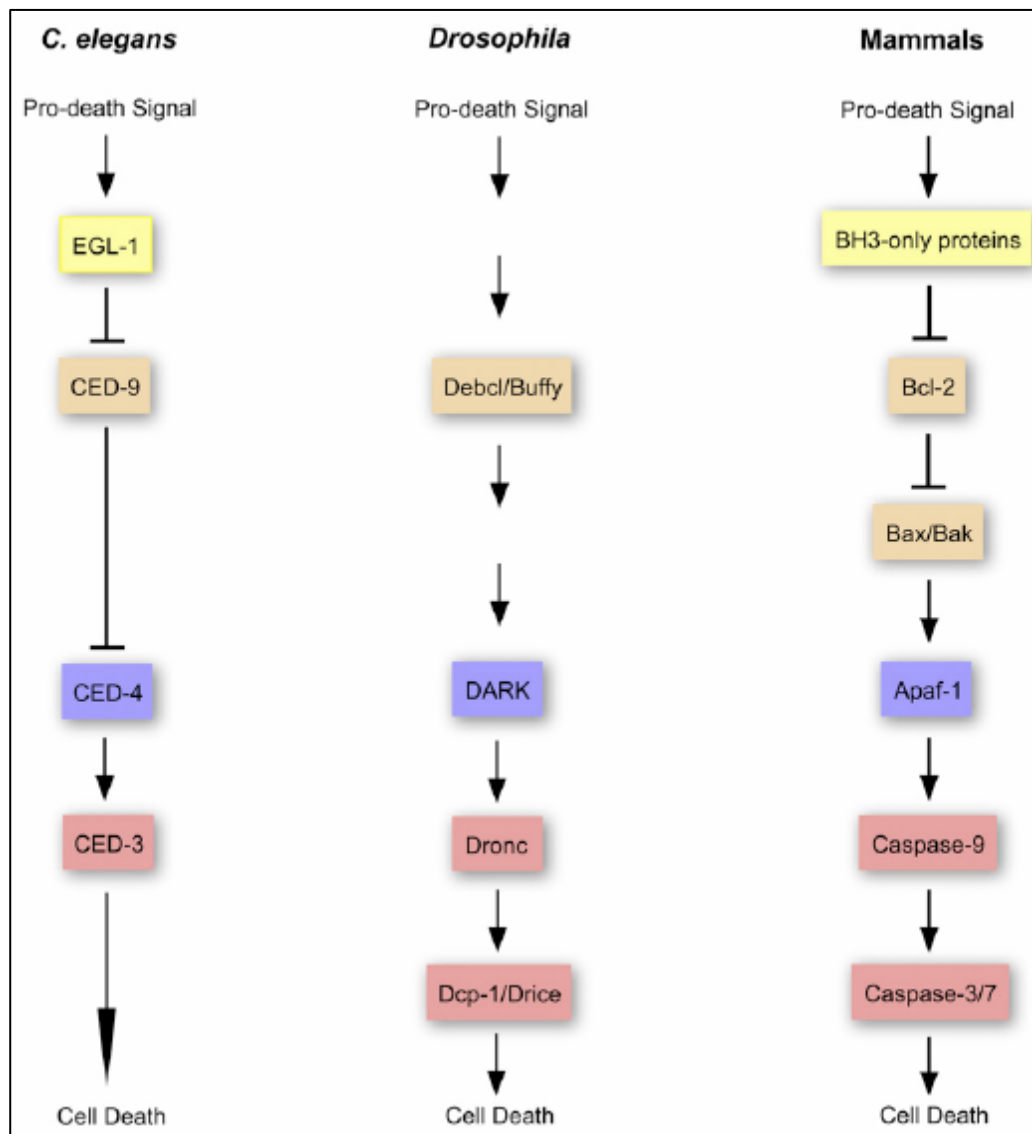


Figure C5 : L'apoptose, un mécanisme très conservé chez *C. Elegans*, la drosophile et les mammifères

(Tiré de Yi and Yan, 2009)

- Chez *C. Elegans*, l'inhibition de CED-9, membre de la famille anti-apoptotique Bcl-2, par EGL-1, permet à CED-4 d'activer la caspase CED-3.
 - Chez la drosophile, Debcl et Buffy entraînent l'activation de Dronc par Dark qui conduit à l'activation de la cascade des caspases.
 - De manière similaire, chez les mammifères, les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL sont inhibées pour permettre l'oligomérisation de Bax et Bak. Des protéines adaptatrices, comme Apaf-1, conduisent à l'activation des caspases et la mort par apoptose.
- Le code couleur représente les orthologues.

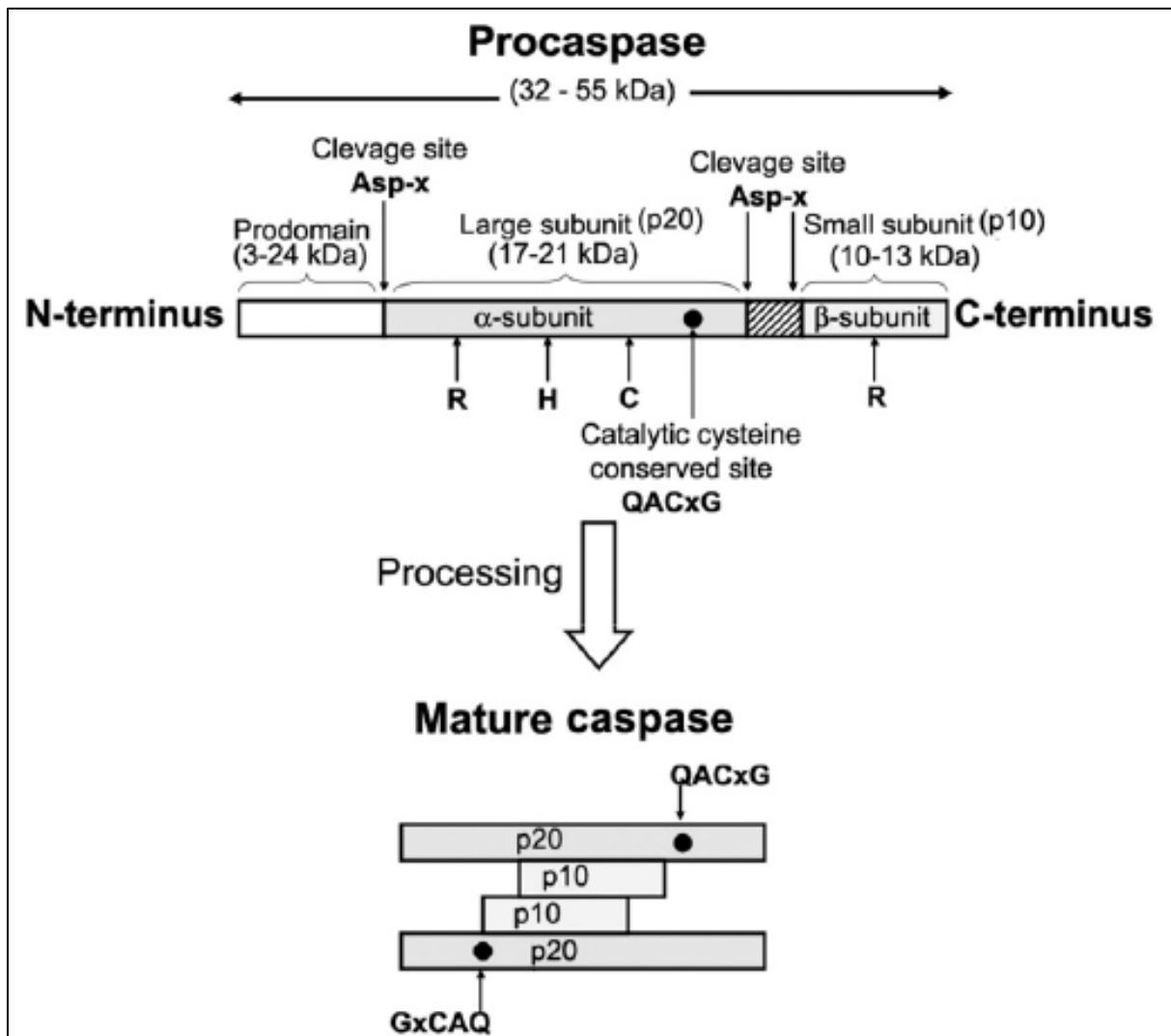


Figure C6 : Représentation schématique de l'activation des caspases

(Tiré de Chowdury et al., 2008)

L'activation des caspases débute par un clivage protéolytique entre la petite et la large sous-unité pour former un hétérodimère, ayant une conformation active. Les caspases fonctionnent sous forme d'hétérotétramères, formés après dimérisation de deux hétérodimères. Les caspases initiatrices existent sous forme de monomères alors que les caspases effectrices sont présentes sous forme de dimères pré-formés.

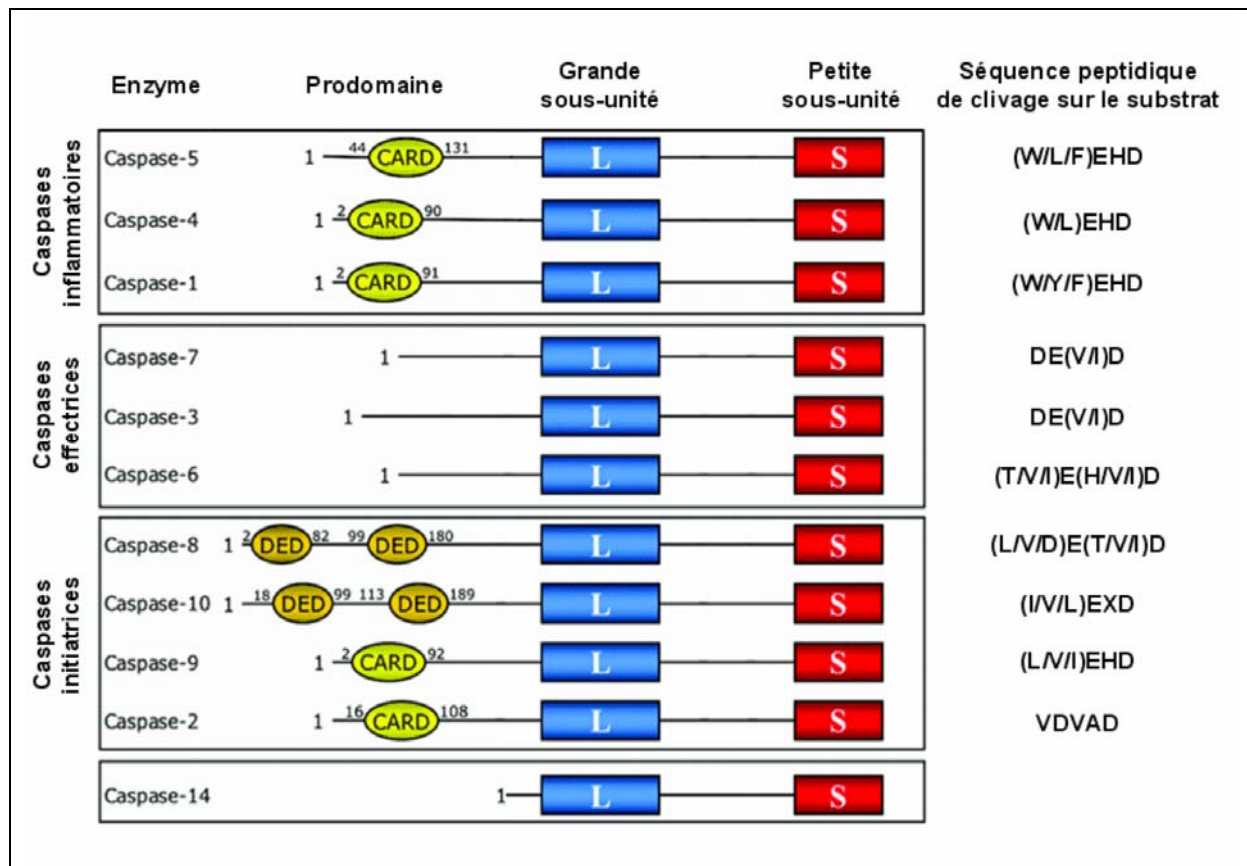


Figure C7 : Classification des caspases

(Tiré de unilim.fr)

II.A.2.3.1.1.2. Les cibles des caspases

Les caspases sont des protéases hautement spécifiques qui clivent leur substrat exclusivement après un résidu aspartate, d'où leur dénomination. Parmi les protéases de mammifères, seul le granzyme B partage cette particularité. Les caspases se fixent à leurs substrats par des interactions entre leur site actif et les acides aminés du site de clivage du substrat. Des études de cristallographie des différents membres des familles de caspases et de leurs substrats ont permis de déterminer que les caspases se lient à leurs substrats par des sites de reconnaissance et des séquences d'acides aminés semblables. Les facteurs majeurs qui décident de la spécificité d'un substrat sont localisés au sein de la petite sous-unité de la caspase (Nicholson, 1999).

La liste des protéines décrites comme étant clivées par les caspases est en perpétuelle augmentation (Casbase : The caspases Database, <http://origin.bic.nus.edu.sg/casbase/>). Les caspases de mammifères avaient environ 280 substrats cellulaires identifiés en 2003 (Fischer et al., 2003) et leur nombre est passé à environ 400 en 2007 (Luthi and Martin, 2007). Les caspases clivent les composants structurels clefs du cytosquelette et du noyau, ainsi que de nombreuses protéines impliquées dans les voies de signalisation (Earnshaw et al., 1999) (Nicholson, 1999) (Denault and Salvesen, 2002) (Fischer et al., 2003). Ces substrats sont classés comme des protéines cytoplasmiques dont le clivage entraîne une désorganisation du cytosquelette, ce qui induit un bourgeonnement membranaire (cf. infra), notamment par clivage : - des protéines constituant les filaments intermédiaires (la kératine 18 (Schutte et al., 2004)), la fodrine, ou la gelsoline impliquée dans la polymérisation de l'actine) (Kothakota et al., 1997) ; - des protéines des jonctions adhérentes assurant les interactions entre les cellules (β -caténine) (Brancolini et al., 1998) ; - des protéines nucléaires (Lamine-A, -B ; récepteur de la Lamine-B, protéines de l'appareil mitotique nucléaire : NuMA, protéines liées à l'ARN et associées aux ribonucléoprotéines, protéine de structure des chromosomes) ; - des protéines du métabolisme et de réparation de l'ADN (PARP (Poly ADP-Ribose Polymérase), protéine de réplication de l'ADN, ADN-topoisomérases, ARN-polymérase), - des protéines kinases (Akt, Raf-1, et MEK), - des protéines de voies de transduction du signal (pro-interleukines, phospholipases), - des protéines du cycle et de la prolifération cellulaire (p21, p27, pRb) (Earnshaw et al., 1999). Dans l'érythropoïèse, les facteurs de transcription GATA-1 et TAL-1 sont des cibles de la caspase-3 activée lors de l'apoptose.

Dans la plupart des cas, le clivage de la protéine cible par la caspase conduit à son inactivation, et la perte de son activité biologique. C'est le cas des protéines anti-apoptotiques comme les

inhibiteurs de caspases : FLIP et IAP (Liston et al., 2003) ou les protéines Bcl-2 ou Bcl-x_L, dont le clivage conduit à la conversion de ces protéines en facteurs pro-apoptotiques (Cheng et al., 1997) (Clem et al., 1998) (Fujita and Tsuruo, 1998).

Les caspases peuvent également induire un gain de fonction de certaines protéines pro-apoptotiques, soit directement, comme les caspases elles-mêmes ou la protéine Bid (« BH3 interacting domain death agonist ») qui ne sont actives qu'après clivage, soit indirectement par dissociation de domaines régulateurs ou inhibiteurs comme le relargage de l'inhibiteur ICAD/DFF45, libérant l'endonucléase CAD/DFF40 qui devient active (Tang and Kidd, 1998). De même, le propre site de clivage des caspases, séparant le prodomaine de la grande sous-unité, contient également ce site spécifique de reconnaissance, ainsi qu'un aspartate ; ce qui leur permet de s'activer mutuellement (cf. supra).

Le clivage de l'ensemble des substrats des caspases, conduit à une série de changements morphologiques et métaboliques de la cellule qui aboutissent à l'apoptose. Cependant, différents groupes de caspases peuvent être activés et cliver des substrats différents dans des cellules différentes ce qui aura des conséquences physiologiques diverses en fonction du type cellulaire, des caspases et du type de stress.

II.A.2.3.1.1.1.3. La régulation des caspases

L'expression, l'activation et l'inactivation des caspases sont physiologiquement et précisément contrôlées dans les cellules par divers mécanismes comportant différents inhibiteurs ou activateurs. L'action des caspases est régulée à plusieurs niveaux, allant du blocage de l'activation des caspases au niveau du DISC « Death Inducing Signaling Complex » jusqu'à l'inhibition de leur activité enzymatique (cf. infra). Le premier niveau de régulation des caspases est représenté par les mécanismes spécifiques et complexes de leur activation : disponibilité des cofacteurs (Apaf-1, cytochrome c), activation des protéines situées en amont dans la voie de signalisation apoptotique (récepteurs). Il existe au moins trois types de molécules régulatrices de l'activité des caspases, qui sont les IAPs, FLIP et les calpaïnes. (cf. infra)

II.A.2.3.1.1.1.3.1. Les protéines inhibitrices de l'apoptose : IAPs

La famille des IAPs a été découverte initialement dans le baculovirus (Roy et al., 1995) (Cheng et al., 1996) (Salvesen and Duckett, 2002). La famille des IAPs comprend 8 membres chez les mammifères (Deveraux and Reed, 1999) et notamment, chez l'homme : NAIP (« Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein »), c-IAP1/HiAP-2, c-IAP2/HiAP-1, XIAP/hILP (« X-linked mammalian Inhibitor of Apoptosis Protein »), la Survivine et BRUCE (« Baculovirus inhibitor of

apoptosis [BIR] Repeat-containing Ubiquitin-Conjugating Enzyme ») (Deveraux and Reed, 1999). Tous les membres de cette famille contiennent une ou plusieurs copies du motif BIR (Birnbaum et al., 1994) (Rothe et al., 1995) (Shi, 2002b) (Shi, 2002a) (Uren et al., 1998) nécessaire pour lier et inactiver les caspases (Liston et al., 2003). Ils inhibent à la fois l'activité des caspases initiateurs et des caspases effectrices. Les IAPs ne se fixent pas ou n'inhibent pas la caspase-8, mais elles se fixent et inhibent son substrat, la pro-caspase-3, arrêtant ainsi la cascade protéolytique et protégeant les cellules de l'apoptose induite par Fas/caspase-8 (Deveraux et al., 1997) (Roy et al., 1997). Dans la voie mitochondriale, l'inactivation des caspases est régulée par XIAP, c-IAP1 et c-IAP2, qui se fixent directement à la caspase initiateur, la pro-caspase-9, et empêchent son activation induite par le cytochrome c (Deveraux et al., 1998). La surexpression de protéines de la famille des IAP inhibe l'apoptose induite par Bax et d'autres protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Deveraux and Reed, 1999). De plus, certaines de ces protéines favorisent la fixation de l'ubiquitine ce qui induit leur dégradation ainsi que celle des caspases auxquelles elles sont liées (Yang et al., 2004) (Suzuki et al., 2001). Les IAPs sont elles-mêmes contrôlées par les protéines SMAC/DIABLO et OMI/HTRA2. Celles-ci sont libérées de la mitochondrie dans le cytoplasme, se lient aux IAPs et les inhibent (Du et al., 2000) (Liston et al., 2003). De cette famille de protéines, XIAP est celle qui représente le plus cette activité d'inhibiteur des caspases, alors que d'autres protéines de cette famille sont impliquées dans la transduction du signal, le cycle cellulaire...

Certains membres de cette famille ont été mis en évidence dans l'hématopoïèse : c-IAP1 a été décrite comme étant nécessaire à la différenciation des macrophages, la Survivine comme exprimée physiologiquement dans l'hématopoïèse, dans les cellules souches CD34⁺ et les progéniteurs hématopoïétiques (Fukuda and Pelus, 2001) (Fukuda and Pelus, 2002) (Fukuda et al., 2004), les lymphocytes T (Okada et al., 2004) (Xing et al., 2004), les polynucléaires neutrophiles (Altnauer et al., 2004), les mégacaryocytes et au cours de la différenciation érythroïde terminale (Gurbuxani et al., 2005). En effet, une diminution de l'expression de la Survivine interfère avec le cycle cellulaire des proérythroblastes et des érythroblastes basophiles ce qui aboutit à un blocage de la différenciation érythroïde terminale.

II.A.2.3.1.1.3.2. Autres protéines régulatrices des caspases

Il y a d'autres molécules régulatrices des caspases que les IAPs : FLIP, la protéine baculovirale p35, et les calpaïnes...entre autres.

L'homologue de v-FLIP (« viral FLICE-Inhibitory Protein », codé par le virus de l'herpès gamma chez les mammifères, est appelé c-FLIP (Irmeler et al., 1997) (Thome and Tschopp, 2001). Les protéines v- et c-FLIPs possèdent 2 domaines DEDs en tandem en N-terminal, ce qui facilite leur interaction au niveau du DISC (cf. infra). FLIP est un homologue inactif de la pro-caspase-8. De ce fait, elle va entrer en compétition avec celle-ci et bloquer soit le recrutement de la pro-caspase-8 au niveau du complexe du récepteur de mort, soit son activation en inhibant son clivage (Tschopp et al., 1998) (Krueger et al., 2001). c-FLIP a été décrite comme intervenant dans l'activation de NF-KB et la régulation de la prolifération lymphocytaire T (Chang et al., 2002) (Irmeler et al., 1997). Au cours de l'érythropoïèse, c-FLIP a été décrite comme étant exprimée dans les cellules souches CD34⁺ et les progéniteurs érythroïdes précoces. Cette expression de c-FLIP serait corrélée avec une résistance de ces cellules aux cytokines inflammatoires. En progressant dans la différenciation érythroïde, c-FLIP n'est physiologiquement plus exprimée par les érythroblastes. Une surexpression dérégulée de c-FLIP_{short} associée à la présence de la mutation Jak2^{V617F} a été impliquée dans les polyglobulies de Vaquez, ce qui pourrait contribuer à leur résistance à l'activation de la voie Fas (Zeuner et al., 2006) (cf. infra).

La protéine p35 exprimée par le baculovirus est un inhibiteur pan-caspase. Elle cible la plupart des caspases en formant un complexe inhibiteur qui est caractérisé par une liaison thioester stable entre la caspase et p35 (Miller, 1999) (Xu et al., 2001) (Stennicke et al., 2002). La protéine CrmA (« Cytokine response modifier A) du virus de la vaccine est un inhibiteur puissant des caspase-1 et -8 et un faible inhibiteur des caspases -3 et -6 et peut inhiber la voie Fas et inactiver le granzyme B (Zhou et al., 1997) (Zhou et al. 1997) (Renatus et al., 2000).

Les calpaïnes représentent une famille de cystéine protéases Ca²⁺-dépendante de la famille des papaïnases. Les calpaïnes et la caspase-3 partagent certains substrats, comme la fodrine et PARP (Wang, 2000). La calpaïne peut cliver la pro-caspase-3 en un fragment de 29 kDa pour faciliter la poursuite de son clivage et son activation (Blomgren et al., 2001). Dans la mort cellulaire induite par un stress du RE, le rôle des calpaïnes est particulièrement important, en raison de l'homéostasie perturbée du Ca²⁺. Le cisplatine entraîne l'activation de la pro-caspase-12 par la calpaïne.

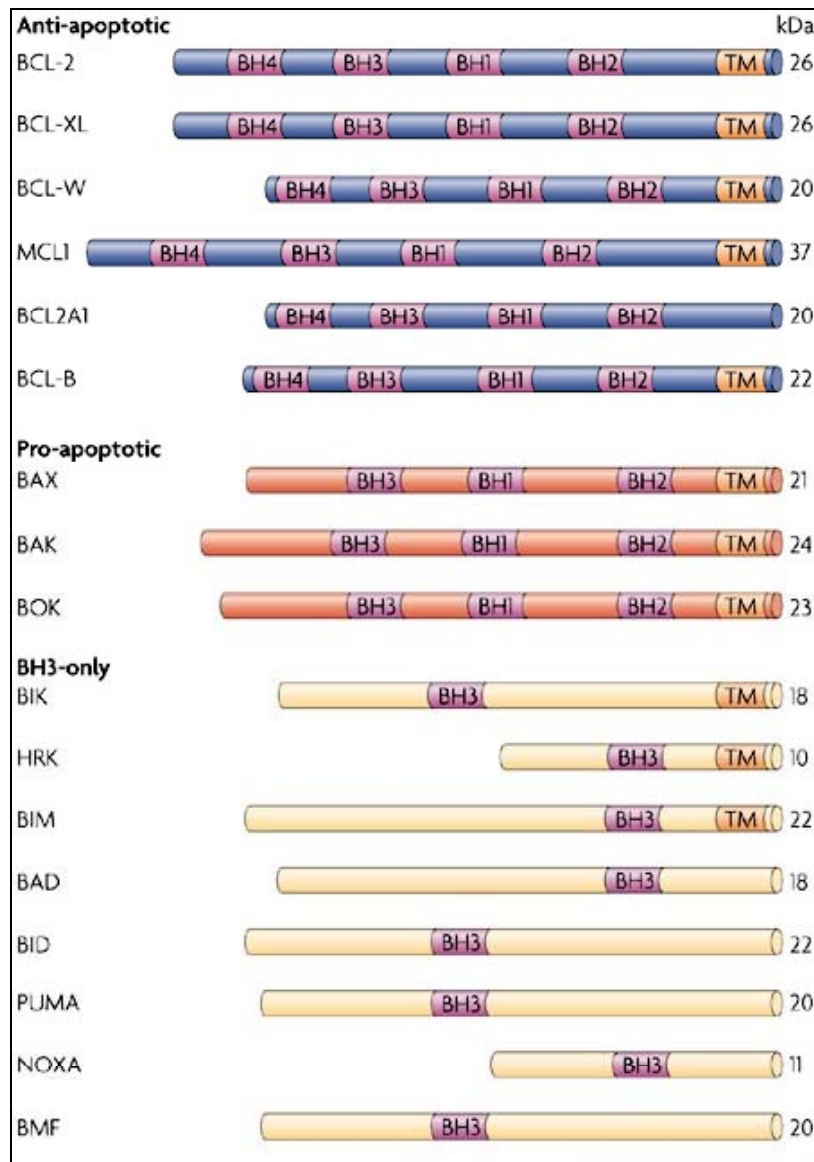


Figure C8 : La famille Bcl-2

(Tiré de Taylor et al., 2008)

La famille des protéines Bcl-2 joue un rôle crucial dans la régulation de l'apoptose par sa capacité à réguler le relargage du cytochrome c de la mitochondrie. Cette famille comprend 3 sous-familles qui contiennent entre 1 et 4 domaines d'homologie Bcl-2 (BH).

La famille anti-apoptotique comprend les protéines avec 4 domaines BH. La majorité de ces protéines possèdent aussi un domaine transmembranaire (TM) et sont associées aux membranes.

La sous-famille des protéines pro-apoptotiques a perdu le domaine BH4 et induit l'apoptose en formant des pores dans la membrane externe de la mitochondrie.

Les protéines de la sous-famille BH3 possèdent une structure très différente et ne contiennent que le domaine BH3.

La calpaïne peut aussi cliver Bcl-x_L et ainsi le transformer en protéine pro-apoptotique (Nakagawa and Yuan, 2000). Un rôle des calpaïnes a été suggéré dans l'apoptose des érythrocytes (cf. chapitre II.A.3.2.) (Pant et al., 1983) et des polynucléaires neutrophiles circulants (Squier et al., 1999).

II.A.2.3.1.1.2. La famille Bcl-2

La protéine Bcl-2 a d'abord été identifiée comme un proto-oncogène dans les lymphomes B folliculaires, où une translocation chromosomique conduit à une expression constitutive de ce gène. Puis, il a été montré que cet oncogène était responsable d'une inhibition de l'apoptose plutôt que d'une activation de la prolifération cellulaire (Vaux et al., 1988). De plus, l'homologie de fonction entre Bcl-2 et CED-9 de *C. elegans*, ainsi que l'étude des souris déficientes en Bcl-2, caractérisées par une apoptose massive des cellules lymphocytaires et des cellules rénales (Veis et al., 1993), ont souligné l'importance de cette protéine comme régulateur de la mort cellulaire. La découverte d'autres protéines homologues de Bcl-2 a permis l'identification de toute une famille de protéines pro- ou anti-apoptotiques (Cory et al., 2003). La plupart des membres de la famille Bcl-2 sont localisés en grande partie dans les membranes subcellulaires incluant la membrane mitochondriale externe, le réticulum endoplasmique et la membrane nucléaire.

Les membres de la famille Bcl-2 partagent une homologie de séquence dans des segments en hélice α appelés domaines BH pour « Bcl-2 Homology » et numérotés BH1 à 4 et peuvent être classés en 3 groupes en fonction de leur structure et de leur fonction :

- 1/ Les molécules anti-apoptotiques à multidomaines qui possèdent quatre domaines BH (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1),
- 2/ Les molécules pro-apoptotiques à multidomaines BH1-3 (Bax, Box et Bok)
- 3/ Les molécules pro-apoptotiques de la sous-famille BH3 (Bim, Bid, Bik et Nix) homologues de EGL-1 de *C. elegans* (Figure C8), caractérisées par la présence d'un seul motif BH, le domaine central BH3.

Les deux premiers groupes de la famille Bcl-2 ont pour rôle de protéger ou de perturber l'intégrité des membranes mitochondriales, tandis que les protéines de la sous-famille BH3 déclenchent la mort cellulaire par leur fixation aux molécules Bcl-2 à domaines multiples, qui induirait ainsi l'inactivation des molécules Bcl-2 anti-apoptotiques ou l'activation des molécules pro-apoptotiques (Joza et al., 2002) (Kaufmann and Hengartner, 2001).

Molécules Bcl-2 anti-apoptotiques

Bcl-x_L comme Bcl-2 serait inséré dans la membrane mitochondriale externe par un motif hydrophobe en C-terminal. La principale fonction décrite des molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 semble consister à permettre l'adaptation et le maintien de l'intégrité de la mitochondrie au cours de perturbations du métabolisme cellulaire (Vander Heiden and Thompson, 1999).

Le mécanisme anti-apoptotique de Bcl-x_L, comme d'autres membres de la famille Bcl-2, serait dû à l'inhibition de l'activité de Bid et Bax, qui coopèrent dans la formation de pores dans la membrane mitochondriale, permettant la libération de composants comme le cytochrome c qui intervient dans la formation de l'apoptosome et la cascade apoptotique (Kuwana et al., 2002). Il a par ailleurs été suggéré un rôle anti-apoptotique plus large de Bcl-2, l'impliquant plus directement dans le contrôle de l'activation des caspases indépendamment de la formation de l'apoptosome (Marsden et al., 2002). Le mécanisme de l'activité anti-apoptotique Bcl-2/Bcl-x_L serait de moduler l'activation Bax/Bak en séquestrant les molécules de la sous-famille BH3 (Cory and Adams, 2002).

La réponse cellulaire à un signal apoptotique dépend du ratio entre les membres pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Les études ciblant les gènes des molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ont permis de mettre en évidence leur rôle physiologique unique, non redondant avec l'activité d'autres inhibiteurs de la mort cellulaire, indiquant que telle protéine Bcl-2 est essentielle pour la survie de tel type cellulaire. Dans l'hématopoïèse, les membres de la famille Bcl-2 sont des régulateurs essentiels de l'homéostasie déterminant la survie et la différenciation des cellules progénitrices. Ainsi, Bcl-2 est nécessaire pour la survie des cellules rénales, des cellules souches de mélanocytes et des lymphocytes matures ; Bcl-x_L à la survie des cellules neuronales, érythroïdes et mégacaryocytaires (Kozuma et al., 2007) ; Bcl-w à la survie des progéniteurs des spermatozoïdes ; A1 à la survie des polynucléaires neutrophiles et Mcl1 à l'implantation du zygote (Cory and Adams, 2002). Mcl1 a également été décrite au cours de différentes étapes de maturation de l'érythropoïèse et de la granulopoïèse où elle aurait un rôle dans la régulation de l'apoptose des cellules myéloïdes (Zhou et al., 1998) (Josefsen et al., 2000).

Bcl-x_L, par son effet antagoniste, est considérée comme étant la principale protéine impliquée dans la protection de l'apoptose des progéniteurs érythroïdes (cf. chapitre **I.D.1.2.2.1.3.1.**).

Molécules Bcl-2 pro-apoptotiques

Les protéines à multidomaines BH, Bax et Bak sont nécessaires à la voie apoptotique mitochondriale (Lindsten et al., 2000) (Wei et al., 2001). Lors de l'apoptose, Bax s'intègre dans la membrane mitochondriale et contribue avec Bak à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie, à la chute du potentiel mitochondrial et à la libération de protéines apoptogènes comme le cytochrome c dans le cytoplasme (Mikhailov et al., 2003). L'oligomérisation de Bax semble être nécessaire pour son activité (Antonsson et al., 2000). Il y aurait une coopération fonctionnelle entre Bax et Bak (Nechushtan et al., 2001) (Mikhailov et al., 2003). Bax et Bak sont également impliqués dans l'initiation de l'apoptose au niveau du réticulum endoplasmique où ils induisent la libération d'ions Ca^{2+} qui peuvent conduire à l'activation des caspases (Zong *et al.* 2003). Le produit de clivage de Bcl-2 ou Bcl-x_L par la caspase-3 ou les calpaïnes aurait une activité mimant Bax et ainsi favoriserait l'induction de l'apoptose (Cheng et al., 1997) (Clem et al., 1998) (Fujita and Tsuruo, 1998) (Nakagawa and Yuan, 2000).

Les progéniteurs érythroïdes expriment constitutivement des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bid, Bad, Bax et Bak (Gregoli and Bondurant, 1997) (Testa, 2004). Si ces molécules sont connues pour être actives lors de l'apoptose, leur rôle reste à préciser au cours de la différenciation érythroïde. Alors que, l'équilibre du ratio entre Bcl-x et Bax semble important dans la régulation de la survie ou de l'apoptose au cours du développement d'autres types cellulaires comme les neurones ou les gonades, l'inhibition de Bax ne permet pas de corriger ou d'améliorer l'anémie par avortement intra-médullaire des érythroblastes matures observée dans les souris bcl-x^{-/-} (Wagner et al, 2000).

Il a récemment été mis en évidence, au cours de la différenciation érythroïde terminale, que la molécule Nix, un autre membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 (Kondo et al., 1997) jouerait un rôle essentiel pour la régulation de l'érythropoïèse (Nijhawan et al., 2003). Nix a la propriété de se fixer à Bcl-x_L et également à la membrane mitochondriale pour participer à sa dépolarisation (Imazu et al., 1999). La surexpression de Nix peut induire l'apoptose (Ranger et al., 2001) (Opferman et al., 2003). Au cours de la différenciation érythroïde, Bcl-x_L, en se fixant à Nix, inhiberait son potentiel pro-apoptotique. Les érythroblastes des souris n'exprimant pas Nix sont hypersensibles à la stimulation par l'Epo et résistants à l'induction de l'apoptose. Il semble qu'un des rôles de Nix serait le maintien de l'homéostasie, en évitant un excès de différenciation terminale d'érythroblaste. Il y aurait ainsi un équilibre entre l'effet pro-apoptotique de Nix et

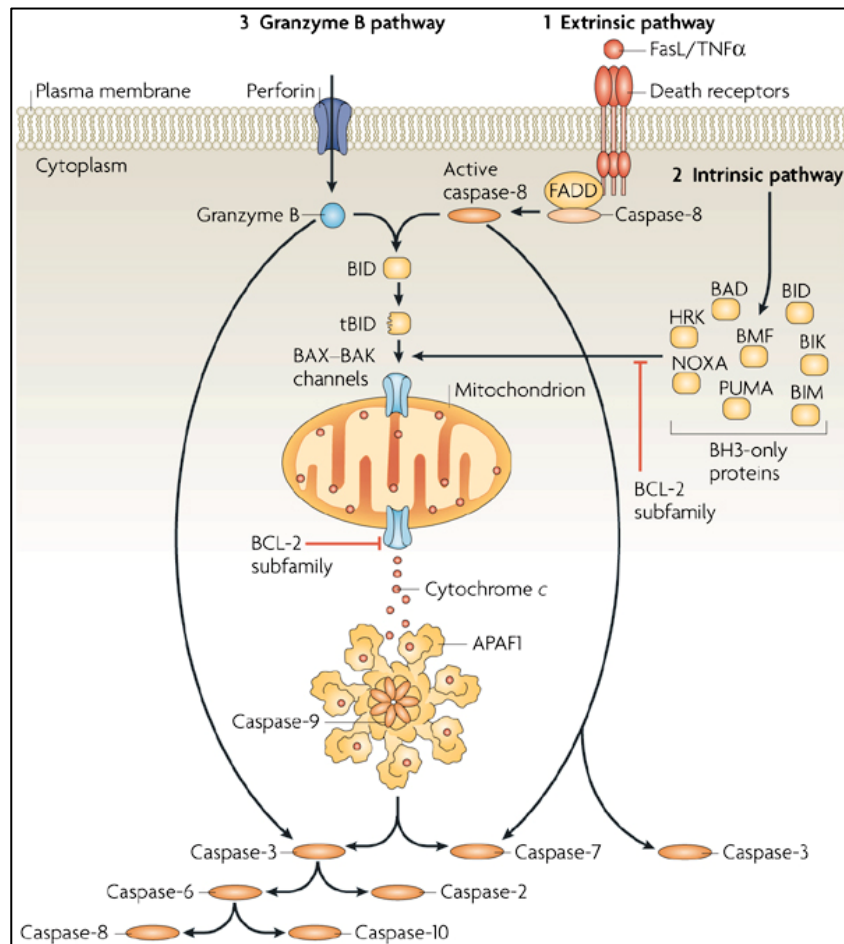


Figure C9 : Les voies de l'apoptose

(Tiré de Taylor et al., 2008)

- L'activation des caspases par la voie extrinsèque implique la liaison d'un ligand de mort extracellulaire aux récepteurs de mort transmembranaire. Ceci provoque le recrutement de protéines adaptatrices, qui à leur tour recrutent la caspase-8 qui va s'auto-activer. La caspase-8 activée va activer les caspase-3 et -7, qui vont cliver leurs substrats et entraîner la mort cellulaire.

Dans les cellules de « type II », la voie extrinsèque peut rejoindre la voie intrinsèque au niveau de la protéolyse de Bid par la caspase-8. Bid tronqué (tBID) va induire le relargage du cytochrome c de la mitochondrie et l'assemblage de l'apoptosome (comprenant 7 molécules de APAF1 et 7 homodimères de caspase-9).

- Dans la voie intrinsèque, divers stimuli provoquant un stress cellulaire ou des lésions activent des protéines de la famille BH3 qui vont inhiber les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et induire l'assemblage de l'oligomère Bak-Bax dans la membrane externe de la mitochondrie. Ceci va permettre le relargage du cytochrome c depuis l'espace intermembranaire vers le cytosol où il va participer à l'assemblage de l'apoptosome. La caspase-9 alors activée va alors induire une cascade d'activation de caspases.

- La voie du Granzyme B met en jeu le relargage dans la cellule cible, de granules spécifiques provenant de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) ou de natural killer (NK). Ces granules contiennent la perforine qui induit la formation de pore dans la membrane de la cellule cible pour permettre l'entrée du granzyme. Le Granzyme B peut cliver Bid pour entraîner l'apoptose.

anti-apoptotique de Bcl-x_L (Kondo et al., 1997). Le fait que Nix soit exprimé de façon parallèle à Bcl-x_L laissait supposer que Nix avait d'autres propriétés au cours de l'érythropoïèse. Certaines de ces propriétés ont été éclaircies récemment : Nix est également impliqué dans les processus d'élimination des mitochondries dépolarisées par autophagie au cours de la maturation érythroïde terminale (cf. chapitre **II.B.**) (Sandoval et al., 2008).

II.A.2.4. Voies de signalisation de l'apoptose

Il existe deux voies majeures d'activation des caspases : (1) la voie des récepteurs de mort (voie extrinsèque) *via* le DISC : complexe d'activation des pro-caspases-8 et-10; et (2) la voie mitochondriale (voie intrinsèque) avec formation de l'apoptosome comme complexe d'activation de la pro-caspase-9. Deux autres complexes activateurs ont également été caractérisés : l'inflammasome qui est impliqué dans l'activation des caspases-1 et -5, et le PIDDosome qui induit l'activation de la caspase-2. Il existe en plus de ces axes principaux d'autres voies comme celles du granzyme B et du RE. Les fonctions de ces complexes sont très spécialisées et ils sont activés en réponse à des signaux pro-apoptotiques ou inflammatoires. (Figure C9)

II.A.2.4.1. Voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort.

Les récepteurs membranaires de la voie des récepteurs de mort appartiennent à la superfamille des récepteurs du TNF (Locksley et al., 2001), qui présentent un domaine extracellulaire riche en cystéines. Les récepteurs de mort contiennent également dans leur région cytoplasmique un domaine de mort DD d'environ 80 acides aminés, qui permet le recrutement d'autres protéines possédant aussi un domaine DD et qui assure la propagation du signal de mort (Ashkenazi and Dixit, 1998). Les récepteurs de mort les mieux caractérisés sont Fas (ou CD95) activé par son ligand FasL, le récepteur TNF-R1 qui lie le TNF- α , TRAIL-R1 et TRAIL-R2, qui sont les récepteurs de TRAIL (Figure C10) et DR3 dont le ligand est Apo3L (Chicheportiche et al., 1997) (Ashkenazi and Dixit, 1998) (Peter and Krammer, 1998) (Rubio-Moscardo et al., 2005) (Suliman et al., 2001). L'activation de ces récepteurs par leur ligand respectif conduit à l'induction de l'apoptose.

La cascade d'activation de l'apoptose induite par les interactions FasL/Fas et TNF- α /TNFR1 est la mieux caractérisée. Dans ces modèles, ces récepteurs sont regroupés en grappe pour fixer un trimère de ligands homologues, ce qui conduit à la fixation du ligand : des protéines cytoplasmiques adaptatrices, possédant des DD correspondants aux DD du récepteur, sont recrutées.

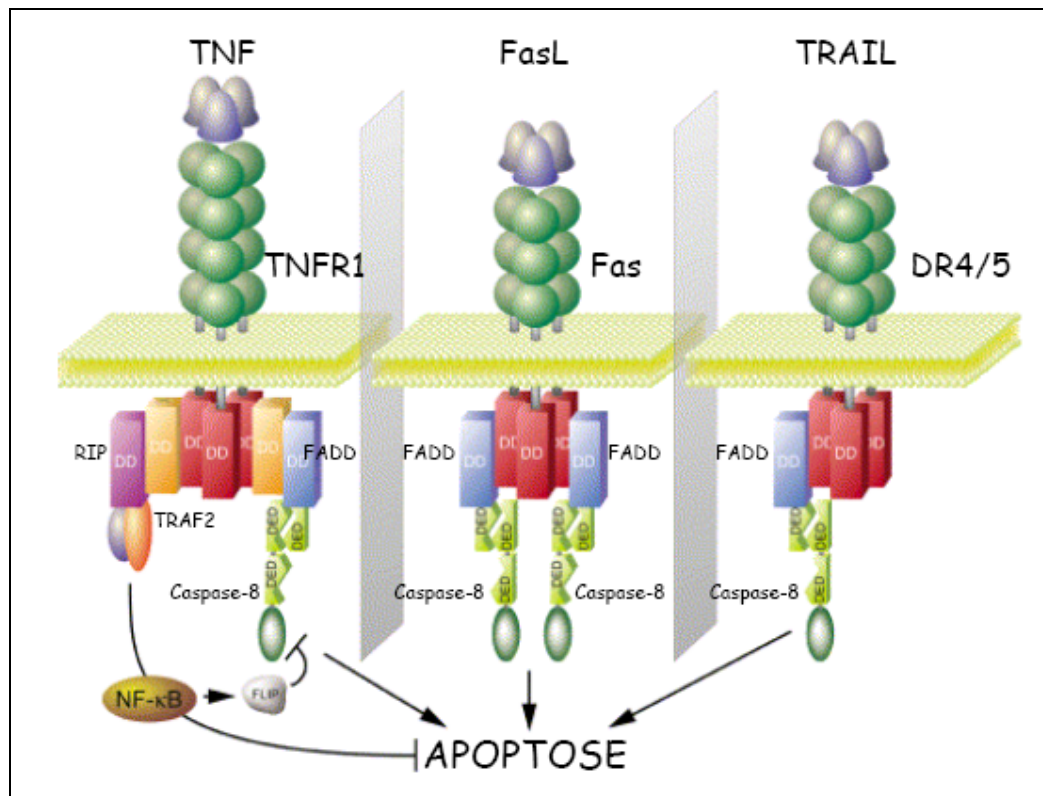


Figure C10 : Représentation schématique de la composition du DISC pour chaque type de récepteur de mort

(Tiré de Danial and Korsmeyer, 2004)

La fixation de FasL à Fas entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice FADD et la fixation de TNF- α à TNFR1 celui de TRADD (« TNF Receptor-Associated Death Domain ») avec FADD et RIP (« Receptor-Interacting Protein ») (Hsu et al., 1995) (Grimm et al., 1996) (Wajant, 2002). Puis, FADD, qui possède également un domaine effecteur de mort DED, recrute au niveau du récepteur plusieurs pro-caspases-8 ou -10, par liaison de domaines homologues DED-DED, ce qui aboutit à la formation du complexe de signalisation DISC. La forte concentration locale de molécules de pro-caspase-8, douées d'une activité catalytique basale, conduit à l'auto-activation de ces caspases. Les caspases-8 activées initient alors la cascade des caspases, responsable de l'exécution du programme de mort cellulaire (Kischkel et al., 1995).

La pro-caspase-10 est aussi activée par le DISC, formant un hétérotétramère actif (Kischkel et al., 2001) (Sprick et al., 2002). Cependant, la fonction spécifique de la caspase-10 n'est pas encore bien connue.

II.A.2.4.2. La voie mitochondriale ou voie intrinsèque

La mitochondrie joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'apoptose (Orrenius, 2004) (Green and Kroemer, 2004). De nombreux signaux pro-apoptotiques provenant de divers stimuli comme la privation relative en facteurs de croissance (tel que l'Epo au cours de l'érythropoïèse), un stress cytotoxique, un stress oxydatif, ou des lésions de l'ADN convergent vers cet organelle. Les événements apoptotiques mitochondriaux sont sous le contrôle et la régulation des membres de la famille des protéines Bcl-2 (Cory and Adams, 2002) (cf. supra).

Tous ces stimuli conduisent à la perméabilisation de la membrane mitochondriale interne qui induit une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) favorisant la libération dans le cytosol, par le pore de transition de perméabilité (PTP), de deux groupes de protéines pro-apoptotiques normalement localisées dans l'espace intermembranaire (Figure C9) (Saelens et al., 2004). La perméabilisation des membranes mitochondriales est généralement considérée comme le point de non-retour dans le processus apoptotique.

Le premier groupe de ces molécules pro-apoptotiques comporte le cytochrome c, Smac/DIABLO et la sérine protéase HtrA2/Omi (Cai et al., 1998) (Du et al., 2000) (van Loo et al., 2002) (Garrido et al., 2006b). Ces protéines activent la voie mitochondriale d'activation des caspases. Chez les mammifères, la protéine centrale de l'apoptosome est la protéine de 140 kDa appelée Apaf-1, qui est l'homologue de CED-4 (Chinnaiyan, 1999) (Hengartner, 1999) (cf. supra). En présence de cytochrome c et d'ATP, Apaf-1 s'oligomérisse pour former un très grand complexe appelé « apoptosome » (700-1400 kDa). La pro-caspase-9 est recrutée dans ce complexe par des

interactions entre domaines CARD, pour aboutir à son activation (Hu et al., 1998) (Jiang and Wang, 2000) (Costantini et al., 2002). Smac/DIABLO et HtrA2/Omi ont été décrits comme favorisant l'apoptose en inhibant l'activité des IAP (van Loo et al., 2002) (Schimmer, 2004) qui eux même jouent un rôle inhibiteur de l'activation des caspases (cf. supra).

Le second groupe de protéines pro-apoptotiques comprend le facteur AIF et l'endonucléase G qui sont libérés par la mitochondrie dans le cytoplasme. La libération de ces protéines est un évènement apoptotique tardif qui n'intervient qu'une fois que la cellule est engagée dans le processus de mort cellulaire. AIF est impliquée dans la dégradation de l'ADN (cf. infra) et affecte aussi la mitochondrie, en provoquant une chute du $\Delta\Psi_m$ et favorisant la libération du cytochrome c (Cande et al., 2002).

II.A.2.4.3. Les autres voies d'activation de l'apoptose

II.A.2.4.3.1. Le PIDDosome, complexe protéique activateur de la caspase-2

Bien que la caspase-2 soit une des premières caspases apoptotiques découvertes, ses fonctions physiologiques sont encore mal connues. La caspase-2 comprend un domaine CARD qui lui permet de former des homodimères (Butt et al., 1998) (Baliga et al., 2004) et d'être recrutée dans un complexe protéique appelé « PIDDosome », semblable à l'apoptosome Apaf-1/caspase-9 (Tinel and Tschopp, 2004). Les protéines adaptatrices RAIDD (RIP-Associated ICH-1/CED-3-homologous protein with Death Domain) et PIDD (P53-Induced protein with Death Domain) ont été identifiées comme les éléments de ce grand complexe. Dans certaines cellules, il a été mis en évidence que la caspase-2 est nécessaire à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et à la libération de facteurs apoptogéniques, en réponse à des agents endommageant l'ADN (Zhivotovsky and Orrenius, 2005). La caspase-2 est également nécessaire à la voie TRAIL *via* TRADD et RAIDD indépendamment du « PIDDosome » (Wagner et al., 2004) (Shin et al., 2005), dans l'apoptose induite par un choc thermique (109,110Kumar 2007) et la mort cellulaire des ovocytes (Nutt et al., 2005). Il a également été montré que la caspase-2 est associée à la voie Fas/DISC mais sans être indispensable à l'induction de la mort cellulaire *via* Fas (Lavrik et al., 2006). L'évènement principal dans l'activation de la caspase-2 semble être sa dimérisation, qui est inhibée dans les cellules non-apoptotiques par sa phosphorylation (Shin et al., 2005) (Nutt et al., 2005). Le mécanisme par lequel la caspase-2 induit l'apoptose est peu clair, mais il semble qu'un modèle plausible serait le clivage de Bid par la caspase-2 qui induirait la dépolarisation de la membrane mitochondriale (Bonzon et al., 2006). Toutefois, l'absence d'anomalies dans les

souris déficientes en caspase-2 semble indiquer que la caspase-2 n'est pas indispensable à la mort cellulaire ou qu'elle y joue un rôle redondant au cours de l'apoptose (Marsden et al., 2004).

II.A.2.4.3.2. L'inflammasome complexe activateur des caspases-1 et -5

L'activation des caspases initiateuses -1 et -5 s'effectue dans un complexe appelé « l'inflammasome » (Martinon and Tschopp, 2004), comprenant une molécule de type ASC (*Associated Speck-like protein containing a CARD*) ou de la famille NLR (*NBD ou NOD-Like Receptors*). L'activation de ces caspases intervient dans la maturation des cytokines IL-1 β et IL-18, qui jouent un rôle central dans la réponse immunitaire aux pathogènes microbiens.

II.A.2.4.3.3. Voie du Réticulum Endoplasmique.

Le RE est le site d'assemblage des chaînes polypeptidiques destinées à être sécrétées ou acheminées dans des compartiments subcellulaires divers. Le RE est également un centre de régulation de la mort cellulaire. L'accumulation dans la lumière du RE de protéines mal repliées ou dépliées et l'altération de l'homéostasie de l'ion Ca²⁺ induit l'apoptose (Kaufman, 1999) (Ferri and Kroemer, 2001). La caspase initiateuse de cette voie est la caspase-12 qui est localisée sur la face cytoplasmique du RE (Nakagawa et al., 2000). Le stress par excès de protéines altérées, a pour conséquence la translocation de la caspase-7 à la surface du RE, qui clive et active alors la pro-caspase-12. La caspase-12 induit l'activation de la caspase-9 qui agit à son tour en activant les caspases-3, -6 et -7 (Lamkanfi et al., 2002) (Rao et al., 2001) (Rao et al., 2002). Dans cette voie d'activation, le cytochrome c n'est pas libéré de la mitochondrie.

II.A.2.4.3.4. La voie Perforine/Granzyme

La voie extrinsèque passant par l'interaction Fas/FasL est la voie apoptotique prédominante des cellules cibles des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) (Brunner et al., 2003). Cependant, les CTL sont aussi capables d'exercer leurs effets cytotoxiques sur des cellules tumorales ou des cellules infectées par des virus *via* une autre voie qui met en jeu la sécrétion de Perforine, qui en formant un pore transmembranaire permet la libération de granules dans le cytoplasme de la cellule cible (Trapani and Smyth, 2002). Les sérines protéases granzyme A et granzyme B sont les composants les plus importants de ces granules (Pardo et al., 2004). Le granzyme B active les caspases-8 et -10 (Heusel et al., 1994) et participe à la dégradation de l'ADN par l'activation de CAD (Sakahira et al., 1998). Le granzyme B altère également la mitochondrie (Beresford et al., 1999) (Shresta et al., 1999) en amplifiant le signal apoptotique *via* le clivage spécifique de Bid et la libération du cytochrome c (Barry and Bleackley, 2002) (Russell and Ley, 2002). Cependant, le granzyme B

peut aussi activer directement la caspase-3 et entraîner ainsi l'induction de la phase d'exécution de l'apoptose.

La voie du Granzyme A est aussi importante dans l'apoptose induite par les CTL. Cette voie est indépendante des caspases et met en jeu l'activation de DNase (Fan et al., 2003) entraînant des lésions de l'ADN et la perte de l'intégrité de la chromatine (Martinvalet et al., 2005).

II.A.2.4.4. La phase d'exécution de l'apoptose

Les voies extrinsèque et intrinsèque aboutissent à la phase d'exécution, considérée comme la voie finale de l'apoptose. C'est lors de l'activation des caspases exécutrices que commence cette phase d'apoptose. L'activation des caspases exécutrices diffère entre les voies extrinsèque et intrinsèque. Dans la voie des récepteurs de mort, deux types de voies de signalisation ont été décrits (Scaffidi et al., 1998). La voie dite de « type I » est caractérisée par un taux élevé de formation de DISC et de caspase-8 active. La caspase-8 activée induit l'activation en aval, des caspases effectrices -3 et -7. Dans les cellules de « type II », la formation de DISC et l'activation de caspase-8 sont moindres. Dans ce cas, la signalisation nécessite une boucle d'amplification supplémentaire qui implique le clivage de Bid par la caspase-8 pour produire tBid qui participe à la libération mitochondriale de cytochrome c (Korsmeyer et al., 2000) (Kuwana et al., 2002). La libération de cytochrome c par la mitochondrie aboutit à la formation de l'apoptosome, suivie de l'activation de la pro-caspase-9, qui clive à son tour en aval, les caspases effectrices -3 et -7. La cascade apoptotique des cellules de « type II » peut être bloquée par des membres de la famille Bcl-2 comme Bcl-2 et Bcl-x_L (cf. infra).

Dans la voie intrinsèque, la formation de l'apoptosome et l'activation de la pro-caspase-9 aboutissent au clivage des caspases effectrices -3 et -7, amorçant la cascade de la mort cellulaire. Les caspases exécutrices activent les protéases qui dégradent les protéines nucléaires et du cytosquelette, ce qui aboutit finalement aux modifications morphologiques et biochimiques observées dans les cellules apoptotiques (Slee et al., 2001). La caspase-3 est considérée comme étant la caspase exécutrice la plus importante car elle clive la majorité des substrats (Porter and Janicke, 1999) et elle est activée par n'importe laquelle des caspases initiatrices. Elle est activée après clivage de la caspase-8 ou -9, mais pas de la caspase-2 (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004) (Degterev et al., 2003) (Porter and Janicke, 1999). La caspase-7 est fortement semblable à la caspase-3 et a la même spécificité de substrat (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004) (Degterev et al., 2003). Bien que structurellement semblable aux caspase-3 et -7, la caspase-6 a une spécificité de substrat quelque peu différente (Thornberry et al., 1997) et sa fonction reste mal connue. Elle ne

semble pas être essentielle pour l'apoptose induite par divers agent, mais il a été montré qu'elle était nécessaire au clivage des protéines nucléaires Lamine-A et B (Zheng et al., 1999) (Zermati et al., 2001).

II.A.2.4.5. Morphologie des cellules apoptotiques

La fragmentation de l'ADN observée lors de l'apoptose, a lieu en plusieurs étapes. Quand la cellule est engagée dans le processus de mort cellulaire, des protéines pro-apoptotiques sont libérées par la mitochondrie dans le cytoplasme : le facteur AIF, l'Endonucléase G. Après sa translocation dans le cytoplasme, l'AIF migre dans le noyau et induit la condensation de la chromatine périphérique et la dégradation oligonucléosomale de l'ADN en fragment de 50-300 kb (Susin et al., 1999) (Joza et al., 2001). Cette forme initiale de condensation nucléaire est appelée "l'étape 1" de la condensation (Susin et al., 2000). L'Endonucléase G est transloquée également dans le noyau où elle clive la chromatine nucléaire et induit la dégradation de l'ADN nucléaire en fragment oligonucléosomale (Li et al., 2001). Les fonctions d'AIF et de l'Endonucléase G sont indépendantes des caspases. L'étape de la dégradation du matériel nucléaire dépend de la caspase-3 qui active spécifiquement l'endonucléase cytoplasmique CAD. En dehors du processus d'apoptose, CAD/DFF40 forme un complexe inactif avec son inhibiteur ICAD/DFF45. Lors de l'apoptose, ICAD/DFF45 est clivé par la caspase-3 et se dissocie de CAD/DFF40 ce qui libère l'endonucléase active, qui peut migrer dans le noyau (Sakahira et al., 1998) (Tang and Kidd, 1998) pour y provoquer la fragmentation oligonucléosomale de l'ADN et une condensation plus prononcée de la chromatine (Enari et al., 1998). Cette forme finale de la condensation chromatinienne est considérée comme "l'étape II" de la condensation (Susin et al., 2000).

La caspase-3 induit aussi la réorganisation du cytosquelette, ce qui aboutit à la rupture du cytosquelette, à l'arrêt du transport intracellulaire, de la division cellulaire, de la transduction du signal (Kothakota et al., 1997) et à la désintégration de la cellule en corps apoptotiques. L'asymétrie des phospholipides membranaires et l'externalisation des phosphatidylsérines à la surface des cellules apoptotiques sont la marque de fabrique de cette phase. Bien que le mécanisme d'externalisation des phosphatidylsérines de la membrane plasmique pendant l'apoptose ne soit pas bien compris, il a été associé à la perte d'activité de l'APLT et au flip-flop non spécifique de phospholipides de classes diverses (Bratton et al., 1997). Fas, les caspases-3 et-8 et seraient impliqués dans le processus d'externalisation des phosphatidylsérines dans des érythrocytes sénescents, alors que ce phénomène est caspase-indépendant lors de l'apoptose des

lymphocytes T (cf. chapitre **II.A.3.2.**) (Ferraro-Peyret et al., 2002) (Mandal et al., 2005). L'externalisation des phosphatidylsérines des cellules apoptotiques facilite alors leur reconnaissance par les cellules phagocytaires non inflammatoires (Fadok et al., 2001). Ce processus de phagocytose précoce et efficace sans libération des constituants cellulaires aboutit essentiellement à l'absence de réponse inflammatoire.

II.A.3. Rôle physiologique de l'apoptose

L'apoptose est essentielle au développement de l'organisme et est aussi primordiale que celui de sa contrepartie physiologique, la mitose. L'apoptose joue un rôle complémentaire mais opposé à la mitose et à la prolifération cellulaire dans la régulation du développement de diverses populations cellulaires. Elle permet l'élimination de structures inutiles ou mal formées.

Il est évalué que pour maintenir l'homéostasie dans le corps humain adulte, environ 10 milliards de cellules sont produites chaque jour juste pour équilibrer celles mourant par apoptose (Renehan et al., 2001). Cette quantité peut s'accroître significativement quand le nombre de cellules apoptotiques augmente pendant le développement normal ou le vieillissement et la maladie.

Les phénomènes apoptotiques sont particulièrement importants lors des divers processus liés au développement. L'apoptose participe notamment à la morphogenèse des doigts : les cellules de l'espace interdigital d'un embryon disparaissent par apoptose (Figure C11). La mise en place des systèmes nerveux et immunitaire fait également appel à l'apoptose, où elle assure un nombre correct de différenciation de cellules souches. Pendant le développement embryonnaire, les neurones sont générés en excès. Vingt à 80% de ces cellules vont ensuite mourir par apoptose afin de créer un équilibre entre ces neurones et les cibles qu'ils innervent. En effet, les cellules nerveuses embryonnaires ont besoin pour survivre du facteur de survie NGF (Nerve Growth Factor), produit par les cellules cibles des neurones (Clarke et al., 1998). Seuls vont survivre les neurones qui se connecteront correctement à leur cible. Les autres cellules, incapables de recevoir ce signal, vont mourir par apoptose (Figure C12) (Nijhawan et al., 2000). De même, pour le développement du système immunitaire, seuls les lymphocytes portant des récepteurs aux antigènes spécifiques vont survivre et le reste sera éliminé par apoptose. En effet, autant le système nerveux que le système immunitaire sont caractérisés dans leur développement initial par la surproduction de cellules. Cet excès initial est ensuite suivi par la mort des cellules qui ont échoué à, respectivement, établir des connexions synaptiques fonctionnelles ou produire des antigènes spécifiques (Opferman and Korsmeyer, 2003).

L'apoptose intervient aussi chez l'adulte, pour maintenir l'homéostasie cellulaire qui résulte d'un équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire. Elle permet à l'organisme de contrôler le nombre de cellules et la taille des tissus. C'est le cas par exemple lors du renouvellement des kératinocytes de la peau (Weil et al., 1999) et du contrôle des phénomènes de cicatrisation (Greenhalgh, 1998) ou de la réaction immunitaire (Osborne, 1996). A la fin de la réaction immunitaire, les lymphocytes T activés en surnombre meurent par apoptose, de même que les cellules immunitaires activées ou auto-agressives lors de leur maturation dans les organes lymphoïdes centraux (la moelle osseuse et le thymus) ou dans les tissus périphériques (Osborne, 1996). De même, l'apoptose est un phénomène central lors de l'atrésie des follicules ovariens et dans l'involution de la glande mammaire lors de la phase de sevrage, par exemple (Tilly et al., 1991) (Lund et al., 1996).

Ainsi, l'apoptose peut être activée par des signaux physiologiques normaux, intra- ou extracellulaires, mais aussi par des stimuli pathologiques. En effet, elle est nécessaire pour débarrasser l'organisme de cellules pathogènes comme des cellules infectées par des virus, des cellules tumorales ou des cellules endommagées par un stress oxydatif, par des altérations génétiques, par un choc thermique ou par l'exposition à des agents cytotoxiques. Lorsque les organismes vieillissent, certaines cellules entament leur détérioration plus rapidement et sont éliminées par apoptose. Une théorie est que le stress oxydatif joue un rôle primordial dans la physiopathologie de l'apoptose induit par l'âge, *via* l'accumulation de radicaux libres qui altèrent l'ADN mitochondrial (Harman, 1992) (Ozawa, 1995). Il est clair que l'apoptose doit être fermement régulée car trop peu ou trop de mort cellulaire peut aboutir à des phénomènes pathologiques, comme des défauts de développement, des maladies auto-immunes, neurodégénératives, ou des cancers. (cf. infra)

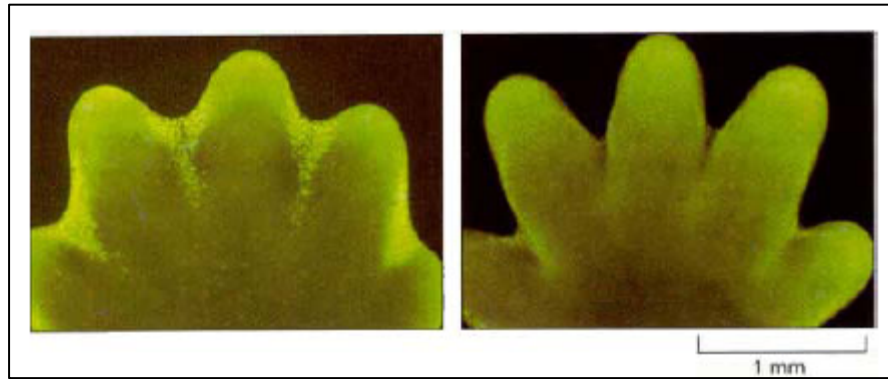


Figure C11 : Mort par apoptose des cellules de la commissure des doigts durant le développement embryonnaire murin

(Tiré de Wood et al., 2000)

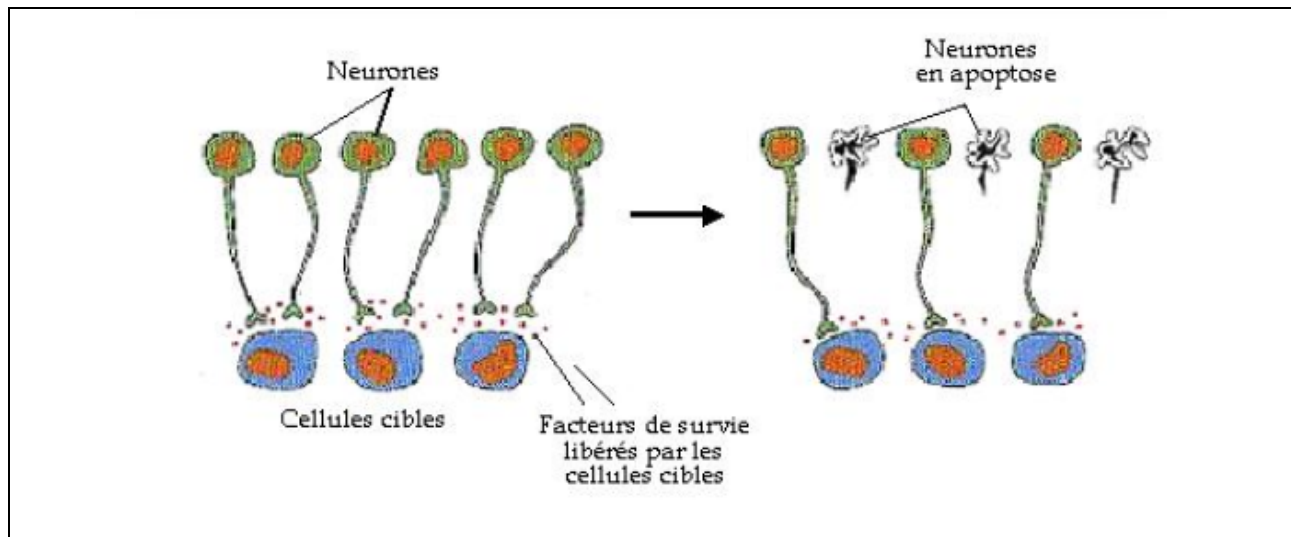


Figure C12 : Intervention de l'apoptose dans le développement du système nerveux

II.A.3.1. Rôle de l'apoptose au cours de l'érythropoïèse

Comme lors des processus cités précédemment, l'apoptose joue un rôle essentiel dans la régulation de l'érythropoïèse (cf. chapitre I). Ce programme de différenciation assure une production continue de globules rouges pour permettre le transport d'oxygène aux tissus périphériques. Cependant, pour éviter une production massive de cellules érythroïdes et une polyglobulie, qui peut mener à l'hyperviscosité sanguine et à la thrombose, un contrôle négatif de ce phénomène est absolument nécessaire (cf. chapitre I).

Ainsi, au cours de l'érythropoïèse toutes les cellules érythroïdes ne vont pas au bout de leur processus de différenciation ; les érythroblastes immatures étant particulièrement sensibles à l'apoptose. A l'état basal, la concentration d'Epo est basse et permet seulement la maturation des érythroblastes les plus sensibles. Les autres érythroblastes se trouvent en situation de privation « relative » en Epo ce qui induit l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Il a également été établi que le taux d'érythroblastes matures dans la moelle contrôlerait rétroactivement l'érythropoïèse en induisant l'apoptose des précurseurs érythroblastiques (De Maria et al., 1999a). Les érythroblastes matures expriment FasL et TRAIL interagissent avec leurs récepteurs à la surface des érythroblastes immatures qui activent les caspases exécutrices par la voie extrinsèque. Cette voie de régulation de l'érythropoïèse a été confirmée dans les souris caspase-8^{-/-} qui sont létales au stade embryonnaire avec une polyglobulie congestive et une altération du développement musculaire (Varfolomeev et al., 1998). L'induction de l'apoptose par la voie des récepteurs de mort peut être impliquée dans le processus physiopathologique des anémies inflammatoires, par activation de la voie des récepteurs de mort *via* les cytokines.

Le destin des érythroblastes est ainsi régulé par l'équilibre entre le taux d'Epo et la voie des récepteurs de mort (Figure E10) qui activent respectivement les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. Ces deux voies peuvent converger au cours de l'érythropoïèse vers la formation de pores mitochondriaux (Figure E11) et aboutir à l'activation de la caspase-3 qui protéolyse GATA-1, TAL-1 et des protéines cytoplasmiques et nucléaires. Le clivage de GATA-1 a comme conséquence un arrêt de l'expression des gènes de différenciation érythroïde et de Bcl-XL (De Maria et al., 1999b) et ce qui aboutit à un arrêt de maturation et à l'apoptose des érythroblastes immatures.

Testa et al ont suggéré que, dans les érythroblastes, la voie extrinsèque d'activation des caspases *via* FasL, TNF ou TRAIL serait de « type II », la réponse à l'activation de Fas étant diminuée par

l'Epo, et probablement par Bcl-XL (De Maria et al., 1999a). Bien que non entièrement démontré, il apparaît que dans les cellules érythroïdes la voie intrinsèque soit la plus importante. Ceci car l'Epo et le SCF sont capables de bloquer l'apoptose induite par FasL en maintenant l'intégrité de la membrane mitochondriale.(cf. chapitre **I.D.1.2.2.1.3.**) (Figure E11).

II.A.3.2. Rôle de l'apoptose dans les érythroblastes matures et les érythrocytes

La sensibilité aux stimuli apoptotiques décroît au cours de la différenciation érythroïde. Autant avant la phase d'activation des caspases les érythroblastes immatures ont un fort potentiel apoptotique, autant à partir du stade acidophile les érythroblastes sont quasiment totalement résistants au déclenchement de l'apoptose (Zeuner et al., 2003b). Les érythroblastes matures sont résistants à l'apoptose induite par la voie Fas malgré une expression importante de Fas à leur surface (De Maria et al., 1999a). Les membres de la famille Bcl-2 voient leur expression décliner en fin de différenciation (Testa, 2004) et ne sont plus exprimés dans les érythrocytes matures (Berg et al., 2001).

Les caspases-3, -6, -7, -8 et -9 sont exprimées par les érythroblastes au cours de leur différenciation (Hristoskova et al., 2007). Les taux de caspase-3 et -8 restent stables au cours de la différenciation et dans les érythrocytes matures humains, alors que l'expression de la caspase-9 diminue dans les érythroblastes matures après la phase d'activation des caspases. Les autres éléments cruciaux de la machinerie apoptotique comme les mitochondries, le noyau, la caspase-9, et le cytochrome c disparaissent en fin de différenciation érythroïde terminale et sont absents des érythrocytes matures (Bratosin et al., 2001). Alors que le taux d'Apaf-1 reste stable dans les érythroblastes matures, l'expression du cytochrome c diminue drastiquement après la phase d'activation des caspases et il a été suggéré que son absence participerait à la résistance des érythroblastes matures au déclenchement de l'apoptose (Hristoskova et al., 2007). L'apoptosome ne se formerait pas dans les érythroblastes matures, même après supplémentation en cytochrome, ce qui suggère d'autres mécanismes d'inhibition de l'activation des caspases dans les érythroblastes matures (Hristoskova et al., 2007). Apaf-1 n'est plus exprimé dans les érythrocytes matures (Bratosin et al., 2001) (Lang et al., 2006). De même, les protéines régulatrices de l'activité des caspases comme les IAPs (XIAP, survivine, c-IAP-1 et c-IAP-2) ou Smac/Diablo n'ont pas été retrouvées comme étant exprimées au cours de la différenciation érythroïde terminale (Hristoskova et al., 2007).

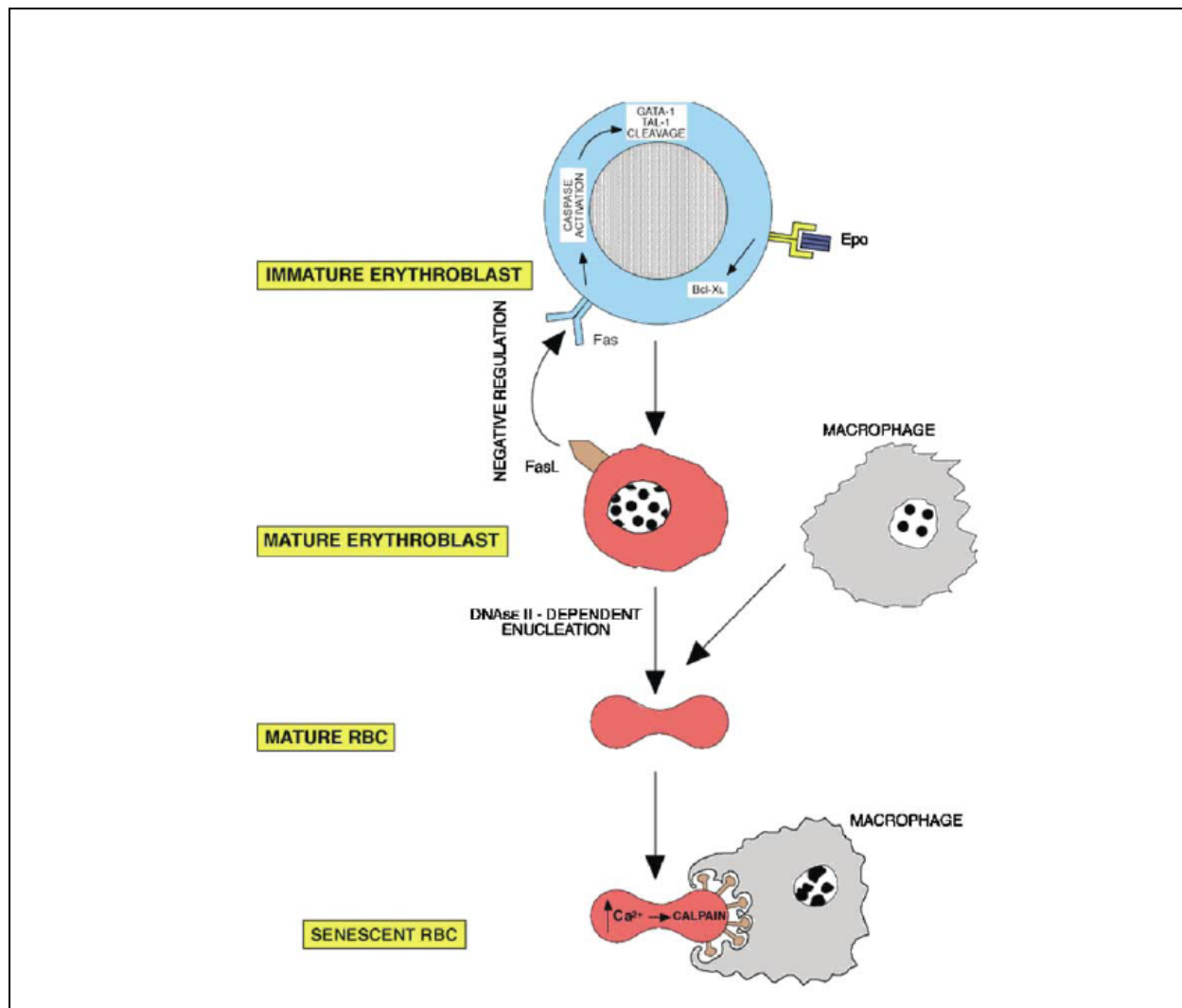


Figure C13 : Principaux processus apoptotiques observés au cours de la différenciation érythroïdes

(Tiré de Testa, 2004)

Les érythroblastes matures exercent un rétrocontrôle négatif sur les érythroblastes immatures *via* Fas-L et les autres ligands des récepteurs de mort.

Dans les dernières étapes de la maturation érythroïdes, il a été décrit chez la souris que la DNase II macrophagique est nécessaire à l'énucléation des érythroblastes acidophiles pour aboutir aux réticulocytes.

Lors de la sénescence des érythrocytes, un processus apoptotique est observé avec une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , l'activation de la calpaïne ayant comme conséquence la microvésiculation membranaire, l'externalisation des phosphatidylsérines et enfin la phagocytose par les macrophages.

La présence du processus apoptotique et plus particulièrement celle d'une possible activation des caspases a également été explorée dans des érythrocytes matures. Ainsi, les érythrocytes sont des cellules anucléées et sans mitochondries qui, après une durée de vie d'environ 120 jours, subissent un processus de sénescence et disparaissent alors de la circulation. Pendant ce processus, les érythrocytes sénescents subissent des changements morphologiques typiques, comme leur diminution de taille qui est la conséquence de la libération progressive de microvésicules de la membrane cellulaire et la transformation de la forme de discocyte en une forme de sphérocyte. En plus de ces changements morphologiques, la membrane cellulaire subit une série de modifications, comme la perte progressive de la spectrine et l'exposition des résidus phosphatidylsérines, observée lors de l'apoptose des cellules nucléées. Au vu des ressemblances des cellules nucléées avec l'apoptose, le terme d'éryptose a été inventé pour décrire la mort programmée des érythrocytes (Lang et al., 2005). Les caspases-3 et -8 érythrocytaires ont longtemps été décrites comme n'étant pas activables par divers types de stimulus pro-apoptotiques (Bratosin et al., 2001). Puis, il a été suggéré que la caspase-3 pourrait jouer un rôle dans le vieillissement des érythrocytes (Mandal et al., 2003). Il a été montré que les globules rouges « jeunes » et ceux plus « âgés » comportaient des différences vis-à-vis de l'activation de la voie Fas. La caspase-3 activée est présente dans les globules rouges « anciens » mais n'est pas détectée dans les globules rouges « jeunes » (Mandal et al., 2003). Il a été mis en évidence dans les globules rouges « âgés » une diminution significative de l'activité de l'APLT dépendante de la caspase-3 activée (Mandal et al., 2002) et un taux plus élevé de phosphatidylsérines externalisées. Il a été démontré que uniquement les globules rouges denses (« âgés ») expriment la caspase-8 qui est activée par la voie Fas. Dans ces globules rouges Fas, FasL, FADD et la caspase-8 retrouveraient leur activité du fait de leur rapprochement secondaire à la diminution de la surface membranaire progressive et leur localisation sur des microdomaines membranaires de type raft.

La caspase-3 est activée par la caspase-8 *via* la voie Fas dans les globules rouges « âgés » les plus denses et non pas dans les plus « jeunes » nouvellement mis en circulation (Mandal et al., 2003) (Mandal et al., 2005) et peut cliver la protéine membranaire bande 3, perturbant son interaction avec la protéine 4.2 (Mandal et al., 2003). La bande 3 est une protéine centrale dans les phénomènes de phagocytose des érythrocytes en fin de vie, dont l'altération prématurée serait impliquée dans certains mécanismes de dysérythropoïèse (Paw et al., 2003) (Rund and

Rachmilewitz, 2005). Il a ainsi été suggéré que l'activation de la caspase-3 participerait à la dégradation de protéines de membrane cruciales pour la forme et la fonction des érythrocytes.

L'augmentation de la concentration intra-érythrocytaire de Ca^{2+} est considérée comme un des mécanismes moléculaires responsable de la sénescence des globules rouges. La microvésiculation de la membrane cellulaire, la diminution de taille de la cellule *via* l'activation Ca^{2+} -dépendante du canal K^+ « Gardos » (Lang et al., 2003), l'externalisation Ca^{2+} -dépendante des phosphatidylsérines *via* l'activation des scramblases (Dekkers et al., 2002) (Woon et al., 1999) (Zhou et al., 2002) et/ou l'inhibition de l'APLT (Seigneuret and Devaux, 1984) aboutissent à la destruction ou à la phagocytose des érythrocytes par des macrophages (Berg et al., 2001). Ce processus de sénescence est inhibé par des inhibiteurs de cystéine protéases, mais pas par les inhibiteurs de caspases (Berg et al., 2001). Il a ainsi été suggéré que l'augmentation intra-érythrocytaire de Ca^{2+} active les calpaïnes, qui induisent le clivage de la spectrine et d'autres modifications morphologiques aboutissant au rétrécissement cellulaire (Figure C13). Les calpaïnes ne semblent pas activer les caspases-3 ou -8 (Berg et al., 2001). L'externalisation des phosphatidylsérines serait indépendante de l'activation des calpaïnes (Berg et al., 2001) mais il a ensuite été montré que la caspase-3 érythrocytaire pourrait être activée après un stress oxydatif et induirait l'externalisation des phosphatidylsérines en inhibant l'activité de l'APLT (Mandal et al., 2002). Ces phénomènes, qui ont une fonction physiologique importante pour éviter l'hémolyse des vieux érythrocytes, peuvent être en partie intégrés dans le mécanisme physiopathologique de certaines anémies (Lang et al., 2005). Des études cliniques semblent montrer que l'Epo, qui inhibe non seulement l'apoptose des érythroblastes au cours de l'érythropoïèse, aurait également un effet en diminuant l'éryptose des érythrocytes circulants, par inhibition de la perméabilité du canal calcique (Jelkmann, 1992) (Polenakovic and Sikole, 1996) (Myssina et al., 2003).

Un autre phénomène de mort cellulaire des érythrocytes nouvellement produits a été décrit et appelé néocytolyse. Cette mort cellulaire érythrocytaire a été observée dans des situations particulières comme le retour d'un séjour en apesanteur ou en haute altitude. Les mécanismes impliqués dans la néocytolyse doivent être encore précisés et sont probablement liés aux variations du taux d'Epo circulant (Foller et al., 2008). L'éryptose ou la sénescence des érythrocytes matures (Bosman et al., 2005) (Kiefer and Snyder, 2000) (Arese et al., 2005) doivent être distingués de la néocytolyse qui est la mort cellulaire d'érythrocytes « jeunes » nouvellement mis en circulation (Lang et al., 2006).

II.A.4. Rôle des caspases dans d'autres processus physiologiques que l'apoptose

Il est largement reconnu que les rôles physiologiques de la plupart des caspases sont conservés à travers les espèces. Des observations de plus en plus documentées (Abraham and Shaham, 2004) (Garrido and Kroemer, 2004) (Launay et al., 2005) d'activité caspase et l'identification de substrats des caspases en l'absence de mort cellulaire ont permis de définir deux fonctions principales des caspases, à savoir :1) un rôle apoptotique et 2) un rôle non apoptotique (Tableau C1).

Ce sont les phénomènes de différenciation cellulaire aboutissant à une énucléation qui ont des aspects pouvant évoquer l'apoptose cellulaire pour lesquels ce rapprochement a été fait initialement. Les modifications cellulaires observées lors de la différenciation ont des points communs avec les modifications morphologiques décrites dans l'apoptose. En effet, les cellules épithéliales du cristallin, les kératinocytes (Weil et al., 1999) et les érythrocytes (Zermati et al., 2001) perdent leur noyau au cours de leur différenciation terminale et c'est dans ces cellules qu'initialement une activation des caspases a été suspectée, explorée et mise en évidence. Le rôle des caspases dans la différenciation en absence de phénomène d'énucléation a également été rapporté dans de nombreux systèmes comme la différenciation des muscles squelettiques (Fernando et al., 2002), des spermatozoïdes de la drosophile (Arama et al., 2003), des mégacaryocytes (De Botton et al., 2002), des plaquettes, des monocytes (Sordet et al., 2002b) et des ostéoblastes (Mogi and Togari, 2003) (Mogi and Togari, 2003). Tous ces modèles suggèrent que les caspases, enzymes clefs de l'apoptose, sont également indispensables à de nombreux processus de différenciation. Ainsi, comme souligné depuis de nombreuses années, différenciation et apoptose sont des processus proches. Le clivage de certaines cibles, et pas d'autres, par les caspases, déterminerait le choix du destin de la cellule. La description de l'activation des caspases et l'identification de substrats des caspases en l'absence de mort cellulaire ont suscité un grand intérêt pour les fonctions des caspases dans les réponses cellulaires au-delà de l'apoptose. L'étude des souris « knock out » pour les caspases, ou de leurs cellules, confirme les rôles pléiotropiques de ces protéases dans la différenciation cellulaire, la prolifération ou l'activation de NF-KB (Tableau C1). Les fonctions non apoptotiques des caspases suggèrent qu'elles peuvent être activées indépendamment ou sans l'induction de la cascade apoptotique, ce qui entraîne le clivage spécifique de certains substrats (Lamkanfi et al, 2007). De même il a été décrit dans les polynucléaires neutrophiles non apoptotiques que la

sérine protéase PR3 (Proteinase 3) clive la caspase-3 en un fragment activé de 22 kDa qui n'induit pas la mort cellulaire mais dont le rôle reste à préciser (Pederzoli et al., 2005).

II.A.4.1. Implication des caspases dans les processus de différenciation cellulaire

II.A.4.1.1. Caspases et différenciation avec énucléation

Les premières preuves d'un rôle des caspases au cours de la différenciation cellulaire proviennent des études sur les cellules du cristallin (Ishizaki et al., 1998) et les kératinocytes (Weil et al., 1999). Lorsque les cellules épithéliales du cristallin de rongeurs acquièrent leurs caractéristiques de différenciation terminale, un membre de la sous-famille caspase-3 est activé et est impliqué dans les modifications morphologiques qui permettent la formation des fibres du cristallin (Ishizaki et al., 1998). L'inhibition des caspases bloque l'énucléation des cellules du cristallin qui a lieu lors de la phase terminale de maturation des cellules (Ishizaki et al., 1998). Ce processus est sous la dépendance du Fibroblast Growth Factor (FGF), nécessaire à la différenciation et à la protection de l'apoptose (Ishizaki et al., 1998). La caspase-6 est aussi activée lors de la différenciation des fibres du cristallin (Foley et al., 2004). Il a également été montré que les caspases sont activées par la voie mitochondriale lors de la différenciation des kératinocytes (Weil et al., 1999) et que cette activation est nécessaire pour l'expulsion du noyau qui a lieu lors de la phase terminale de maturation. Il a ensuite été mis en évidence que la caspase-14 est activée dans cette différenciation (Chien et al., 2002) tout comme la caspase-3 (Okuyama et al., 2004). L'augmentation de l'expression de la caspase-3 et son activation ne sont pas suffisantes pour induire l'apoptose mais la caspase-3 clive et active la protéine kinase C- δ (PKC- δ) qui régule positivement la différenciation des kératinocytes (Fernando et al., 2002).

Bien que la différenciation terminale des cellules érythroïdes, des fibres du cristallin et des kératinocytes soit caractérisée par une énucléation, la plupart des études suggèrent que l'activation des caspases n'est pas directement impliquée dans le processus d'énucléation mais est nécessaire à des phases plus précoces des voies de différenciation (Launay et al., 2005). Dans ces types de différenciation cellulaire, l'activation des caspases sans apoptose donne lieu à un clivage plus sélectif de leurs substrats comme la Lamine B pour les érythroblastes (Zermati et al., 2001) et la PKC- δ pour les kératinocytes (Okuyama et al., 2004) (Okuyama et al., 2004). Les substrats des caspases peuvent aussi varier dans la différenciation. Par exemple, PARP est clivé pendant la différenciation du cristallin et des érythrocytes et n'est pas protéolysé dans la différenciation des kératinocytes.

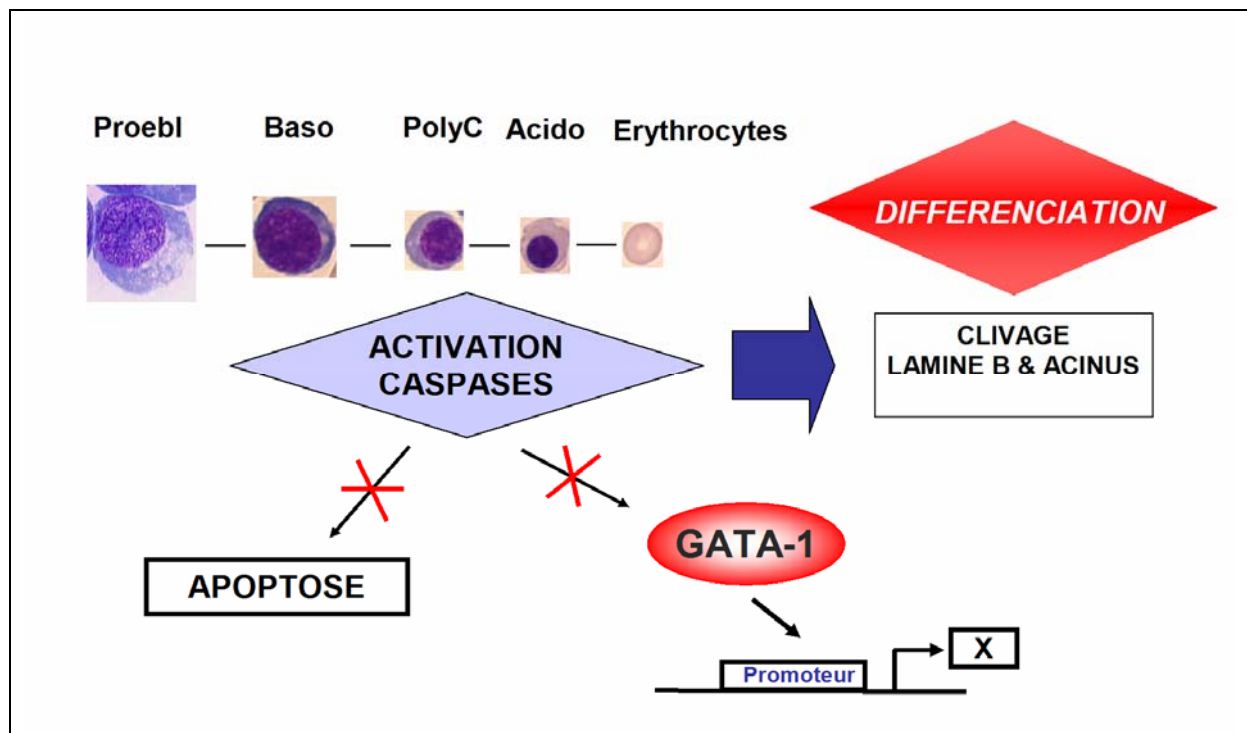


Figure C14 : Les caspases sont activées au cours de la différenciation érythroïde terminale

(D'après Zermati et al, 2001)

L'activation des caspases au cours de la différenciation érythroïde terminale induit le clivage de protéines impliquées dans l'intégrité du noyau ou la condensation chromatinienne, alors que GATA-1 n'est pas protéolysé et qu'il n'y a pas d'induction de l'apoptose.

II.A.4.1.1.1. Rôle des caspases dans la maturation terminale des érythroblastes

Plusieurs observations indiquent que l'activation des caspases est impliquée dans le processus de maturation érythroïde et joue un rôle important dans ce phénomène. Une première étude a montré que les caspases-1, -2, -3, -5, -6, -7, -8, et -9 sont exprimées dans les cellules érythroïdes (Gregoli and Bondurant, 1999). Les taux de pro-caspases-2, -3 et -8 sont nettement plus élevés dans les érythroblastes immatures que dans les érythroblastes matures (Gregoli and Bondurant, 1999). La caspase-3 avec les caspases-9, -7, et -2 est transitoirement activée durant la différenciation érythroïde induite par l'Epo et l'inhibition des caspases bloque la différenciation érythroïde au stade basophile (Zermati et al., 2001) (Kolbus et al., 2002) (Carlile et al., 2004). Récemment, il a été testé l'hypothèse dans le laboratoire selon laquelle les caspases pourraient être activées au cours de l'érythropoïèse normale et expliquer les changements morphologiques observés au cours de la maturation terminale. Il a ainsi été mis en évidence, qu'au cours de la différenciation érythroïde terminale, la caspase-3 est activée de façon transitoire au moment où les changements morphologiques des érythroblastes apparaissent (Zermati et al., 2001). La différenciation des érythroblastes basophiles en polychromatophiles et acidophiles est associée au clivage, par les caspases, de plusieurs protéines classiquement décrites comme étant impliquées dans le processus apoptotique : PARP, la Lamine B et Acinus. Cette activation des caspases se fait par la voie mitochondriale avec dépolarisation de sa membrane et activation de la caspase-9 (Zermati et al., 2001). L'activation de la caspase-3 est associée à l'activation de la caspase-6 et au clivage de la Lamine B, qui pourrait induire la condensation nucléaire comme cela a été décrit au cours de l'apoptose. La protéine Acinus, responsable de la condensation de la chromatine mais pas de sa dégradation, est activée par le clivage de la caspase-3. De manière inversée, bien que les caspases exécutrices soient activées, les cellules n'entrent pas en apoptose puisqu'elles n'expriment pas de phosphatidylsérines à leur membrane et que GATA-1 n'est pas dégradée (Figure C14) (Zermati et al., 2001). Au cours de la différenciation érythroïde l'ADN est uniquement clivé en large fragment de 50 à 200 kb et non pas de façon oligonucléosomale comme lors de l'apoptose ; ICAD n'est pas clivé et AIF n'est pas transloqué dans le noyau (Hristoskova et al., 2007). Une autre étude a suggéré que, durant la différenciation érythroïde de cellules de la lignée érythroïde humaine TF-1, l'absence de fragmentation de l'ADN, malgré l'activation de la caspase-3, serait due à une diminution de l'expression CAD et de son ARNm (Lui and Kong, 2006). Il a été suggéré que p53 décrit comme participant à la différenciation de plusieurs types cellulaires, serait

ROLE DANS L'APOPTOSE		AUTRES FONCTIONS
Activation des caspases initiatrices	Caspase-1	<ul style="list-style-type: none"> - Production d'IL-1 - Différenciation des muscles squelettiques - Migration cellulaire - Activation de NF-KB
Caspase initiatrice ou exécutrice	Caspase-2	<ul style="list-style-type: none"> - Différenciation des érythroblastes, ostéoblastes, macrophages - Réparation de l'ADN - Activation de NF-KB
Caspase exécutrice	Caspase-3	<ul style="list-style-type: none"> - Différenciation des érythroblastes, kératinocytes, macrophages, cristallin, spermatozoïdes, muscles squelettiques, ostéoblastes, trophoblastes du placenta - Inhibition du cycle cellulaire des lymphocytes B - Production d'IL-16 - Formation des plaquettes - Différenciation des cellules souches neurales - Inhibition de la maturation des cellules dendritiques
Activation des caspases initiatrices	Caspase-5	<ul style="list-style-type: none"> - Production d'IL-1
Caspase exécutrice	Caspase-6	<ul style="list-style-type: none"> - Différenciation du cristallin - Régulation positive du cycle cellulaire des lymphocytes B
Caspase exécutrice	Caspase-7	<ul style="list-style-type: none"> - Différenciation des érythroblastes
Caspase initiatrice de la voie des récepteurs de mort	Caspase-8	<ul style="list-style-type: none"> - Prolifération et activation des lymphocytes T - Régulation positive du cycle cellulaire lymphocyte B - Activation de NF-KB - Différenciation des trophoblastes, ostéoblastes, érythroblastes, monocytes - Mobilité cellulaire - Développement des embryons de souris : différenciation des progéniteurs hématopoïétiques
Caspase initiatrice de la voie mitochondriale	Caspase-9	<ul style="list-style-type: none"> - Idem processus de différenciation de la caspase-3 - Différenciation des cellules épithéliales
Caspase initiatrice de la voie des récepteurs de mort	Caspase-10	<ul style="list-style-type: none"> - Non déterminé
Caspase initiatrice de la voie des récepteurs de mort	Caspase-11	<ul style="list-style-type: none"> - Production d'IL-1 - Migration des macrophages
Caspase initiatrice de la voie du réticulum endoplasmique	Caspase-12	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution de l'inflammation - Réponse immunitaire innée
?	Caspase-14	<ul style="list-style-type: none"> - Différenciation des kératinocytes

Tableau C1 : Les différentes fonctions des caspases indépendantes de l'apoptose

(Adapté de Launay et al., 2005)

impliquée lors de l'expulsion du noyau qui caractérise la dernière étape de la différenciation érythroïde (Peller et al., 2003).

L'ajout d'un inhibiteur des caspases comme le ZVAD à la culture érythroïde juste avant la phase d'activation des caspases entraîne un blocage de la différenciation érythroïde au stade basophile (Zermati et al., 2001). Cette observation a été confirmée et approfondie en démontrant le rôle essentiel de la caspase-3 dans la différenciation érythroïde en utilisant une stratégie d'inhibition spécifique de la caspase-3 par ARN interférence (Carlile et al., 2004). Ces données ont aussi été confirmées dans les érythroblastes murins (Kolbus et al., 2002) où il a été montré que Raf-1 prévient l'activation des caspases et empêche la maturation érythroïde en inhibant la différenciation induite par les caspases. Raf-1 en activant la cascade MEK/ERK, induit la prolifération des progéniteurs. Un phénomène opposé est observé dans les souris *Raf1^{-/-}* (Kolbus et al., 2002) : elles sont anémiques en raison de l'inhibition de leur prolifération et l'accélération de la différenciation terminale par l'activation prématurée des caspases (Kolbus et al., 2002). Cette cinétique ressemble à celle induite par l'ajout de TGF- β qui conduit également à une anémie par altération de la prolifération des érythroblastes immatures et une accélération de la différenciation (Zermati et al., 2000).

Il reste nécessaire de déterminer par quels mécanismes la caspase-3 est activée durant la différenciation érythroïde terminale. Il a été récemment montré dans des modèles murins, que l'expression de Fas serait nécessaire à l'activation des caspases impliquées dans la différenciation érythroïde terminale. L'induction de cette expression de Fas serait secondaire à la diminution de la voie Raf-1/ERK (Rubiolo et al., 2006). La différenciation, serait induite par Fas *via* l'activation à la fois de la voie ASK/JNK/p38 et de la cascade des caspases (Rubiolo et al., 2006). Par ailleurs, les souris invalidées *Nix* présentent une augmentation d'érythroblastes polychromatophiles et une des anomalies de la forme des érythrocytes suggérant un défaut de maturation. L'absence de *Nix* aboutit à une anémie avec hyperréticulocytose et une hyperplasie érythro-myéloïde (Schweers et al., 2007). Ces résultats montrent que des protéines pro-apoptotiques comme Fas ou *Nix* sont impliquées dans la différenciation érythroïde.

Ainsi, le destin (apoptose versus différenciation) des précurseurs érythroïdes est décidé en aval de l'activation de la caspase-3. GATA-1 doit être protégé de l'activation des caspases au cours de la différenciation érythroïde car en absence de GATA-1, le processus de différenciation est arrêté au stade d'érythroblaste basophile et les cellules meurent par apoptose.

Lors de ce travail de thèse nous avons cherché à déterminer par quels mécanismes le facteur de transcription GATA-1, qui est clivé par la caspase-3 lors de l'apoptose induite par l'activation de Fas ou la privation en Epo, reste intact lors de la différenciation érythroïde terminale alors que la caspase-3 est également activée.

II.A.4.1.2. Caspases et différenciation sans énucléation

L'activation des caspases a également été mise en évidence comme étant impliquée dans la différenciation de certains types cellulaires nucléés.

Les modifications cellulaires observées lors de la différenciation des cellules du muscle strié ont des critères communs avec les modifications morphologiques décrites lors de l'apoptose (Fernando et al., 2002). Par exemple la réorganisation de l'actine est observée lors des deux phénomènes. La kinase de la chaîne légère de la myosine est une protéine du muscle contractile qui est nécessaire à la vésiculation membranaire des cellules apoptotiques. Au cours de la différenciation du muscle strié, la caspase-3 est impliquée dans la myogenèse chez la souris. La caspase-3 clive et active une kinase MST1 (Mammalian Sterile Twenty-like kinase) qui est impliquée dans la myogenèse et qui aurait comme substrats des membres de la voie p38 MAPK (Fernando et al., 2002). Ces kinases induisent la myogenèse en phosphorylant et en augmentant l'activité de facteur de transcription du muscle squelettique (Fernando et al., 2002). La phase de fusion des myoblastes de rat est sous la dépendance de la diminution de l'expression de la calpastatine. La caspase-1 est indispensable à ce processus en clivant la calpastatine (Barnoy and Kosower, 2003). Il est à noter que la protéine anti-apoptotique Bcl2 est exprimée dans les premières étapes de prolifération de la myogenèse, mais ne l'est plus lors de la phase de différenciation des myoblastes (Huppertz et al., 2001). Le facteur de transcription FKHR (« Forkhead box O1 ») habituellement impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose a été décrit comme étant nécessaire pour la fusion des myoblastes de souris (Bois and Grosveld, 2003). L'activation des caspases a également été décrite dans les phénomènes de spermatogenèse. Drice (équivalent de la caspase-3), Dark (équivalent d'Apaf-1) et Dronc (équivalent de la caspase-9) sont ainsi impliquées dans les modifications morphologiques terminales observées lors de la spermatogenèse des drosophiles et des souris (Arama et al., 2003) (Huh et al., 2004) (Yi and Yuan, 2009) (Arama et al., 2003). A noter que chez les drosophiles les caspases sont activées uniquement dans le cytoplasme car une activation nucléaire entraîne une hypercondensation nucléaire et une stérilité (Arama et al., 2003). Les caspases nucléaires sont inhibées par dBRUCE une protéine de la famille des IAP (Arama et al., 2003) (cf. supra). Ainsi dans ce modèle, la

régulation de l'activité des caspases serait sous la dépendance de la localisation nucléaire et/ou cytoplasmique de la protéine de type IAP : dBRUCE.

L'activation des caspases a également été impliquée dans la différenciation des ostéoblastes induite par BMP-4 (Mogi and Togari, 2003), des ostéoclastes induite par RANKL (Receptor Activator of NF-KB Ligand) (Miura et al., 2004), des cellules souches neuronales (Fernando et al., 2005) et des cellules gliales (Oomman et al., 2005), des trophoblastes villosités placentaires humains (Black et al., 2004), des cellules de carcinome du colon HT29 induite par du butyrate (Cai et al., 2004) et dans le développement post-natal du cervelet de rat (Oomman et al., 2005). Il a également été récemment évoqué que les caspases pourraient être impliquées dans les connexions interneuronales, en participant à l'élimination sélective de certaines dendrites (Yi and Yuan, 2009). La caspase-3 pourrait également être impliquée dans le contrôle du devenir des cellules souches embryonnaires (Fujita et al., 2008).

II.A.4.1.2.1. Rôle des caspases dans la différenciation des cellules hématopoïétiques

II.A.4.1.2.1.1. Rôle des caspases dans la différenciation des monocytes en macrophages

Les progéniteurs myéloïdes provenant de la différenciation de la cellule souche hématopoïétique multipotente comprennent également les progéniteurs de la lignée des cellules mononuclées phagocytaires. Les étapes de maturation interviennent dans la moelle osseuse et incluent les stades monoblaste, promonocyte et monocyte. Au stade monocyte, ces cellules traversent l'endothélium et passent dans la circulation sanguine pour se différencier en macrophage ou en cellule dendritique ou en un ostéoclaste. L'activation de plusieurs caspases, incluant les caspases-3, -8, et -9 est observée au cours de la différenciation des monocytes du sang circulant en macrophages, en réponse au Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF) et en absence d'apoptose. Après traitement des monocytes par le M-CSF la caspase-8 activée clive RIP1, qui va réguler négativement NF-KB et ainsi favoriser la différenciation macrophagique (Rebe et al., 2007). L'inhibition des caspases inhibe cette différenciation (Sordet et al., 2002b), tandis que chez la souris le knock-out conditionnel de la caspase-8 dans les cellules de la moelle osseuse empêche la différenciation de la lignée myélomonocytaire en macrophages (Kang et al., 2004). Cette activation des caspases n'est pas observée lors de la différenciation des monocytes en cellules dendritiques (Sordet et al., 2002b) (Netea et al., 2008). Lors de la différenciation macrophagique, comme au cours de l'érythropoïèse (Zermati et al., 2001), l'activation des caspases-3 et -9 est induite par la voie mitochondriale avec libération de cytochrome c mitochondrial et protéolyse d'Acinus et de diverses protéines impliquées dans la régulation du

cytosquelette et l'adhésion cellulaire alors qu'il semble que certains substrats tels que PARP et la Lamine B soient protégés du clivage par les caspases (Sordet et al., 2002b) (Cathelin et al., 2006). Cette différenciation est inhibée par un inhibiteur des caspases et par l'hyperexpression de Bcl2 (Sordet et al., 2002b). La caspase-8 semble aussi jouer un rôle, car la délétion de son gène inhibe la différenciation des monocytes en macrophages, alors qu'elle n'affecte pas la différenciation en cellules dendritiques ou granulocytaires (Kang et al., 2004). De même, la délétion homozygote du gène de la protéine Bid, impliquée dans l'amplification de la voie des récepteurs de mort (cf. supra), induit une prolifération clonale ressemblant à une leucémie myélomonocytaire chronique (Zinkel et al., 2003). Certaines cibles protéolysées par les caspases dans ce processus de différenciation macrophagique ont été déterminées (Cathelin et al., 2006) mais le mécanisme de la protection sélective de certains substrats des caspases lors de ce processus de différenciation reste encore à élucider.

II.A.4.1.2.2. Rôle des caspases dans la différenciation mégacaryocytaire

L'activation des caspases est également nécessaire à la différenciation mégacaryocytaire. Comme au cours de l'érythropoïèse, les caspases jouent des rôles contrastés au cours de la mégacaryopoïèse. L'activation des caspases induite par Fas inhibe la mégacaryopoïèse. L'anticorps agoniste anti-CD95 induit un arrêt de différenciation des mégacaryocytes par activation des caspases (De Maria et al., 1999a). Un blocage de la différenciation est associé à la protéolyse de GATA-1 et de NF-E2 (De Maria et al., 1999a), deux facteurs de transcription essentiels pour la différenciation mégacaryocytaire terminale (Shivdasani et al., 1995). Bien que la part de la contribution du clivage des facteurs de transcription induite par la stimulation de CD95 dans l'arrêt de la mégacaryopoïèse reste à élucider, la déplétion de GATA-1 semble jouer un rôle majeur dans ce processus. Sur le plan phénotypique, les mégacaryocytes déficients en GATA-1, comme dans les cellules stimulées par l'anti-CD95, n'ont pas d'endomitose et voient leur prolifération diminuer (De Maria et al., 1999a). Ainsi, le clivage des facteurs de transcription apparaît comme un mécanisme responsable d'une régulation négative de la mégacaryopoïèse. Il a été initialement mis en évidence que les souris surexprimant Bcl2 (Ogilvy et al., 1999), ainsi que les souris invalidées pour le gène pro-apoptotique Bim (Bouillet et al., 1999) ont une réduction de moitié du nombre de plaquettes circulantes alors que le nombre des mégacaryocytes médullaires reste inchangé. L'inhibition de la plaquetto-genèse par l'hyperexpression de Bcl2 semble indiquer que la voie intrinsèque de l'activation des caspases est impliquée dans le processus de libération des plaquettes par les mégacaryocytes (Ogilvy et al., 1999). De même, l'hyperexpression du gène

anti-apoptotique Bcl-X_L dans des souris transgéniques montre des anomalies de la fragmentation plaquettaire (Kaluzhny et al., 2002). Il a ensuite été décrit que, comme lors de l'érythropoïèse, l'activation des caspases était impliquée dans la mégacaryopoïèse humaine (De Botton et al., 2002). Tout d'abord, il a été observé chez l'homme, comme dans les modèles murins, que la surexpression de Bcl2, ainsi que l'inhibition des caspases, bloquent la formation des proplaquettes (De Botton et al., 2002). Puis il a été mis en évidence que, l'activation des caspases a lieu à deux étapes de la maturation mégacaryocytaire. Une première étape d'activation de la voie intrinsèque, avec la libération de cytochrome c et l'activation cytoplasmique de la caspase-9 et de la caspase-3, apparaît avant la phase de formation des proplaquettes et est limitée à certains compartiments cellulaires. Puis, une seconde étape d'activation diffuse des caspases apparaît à la fin du processus de maturation après la libération des plaquettes (De Botton et al., 2002). Il est très important de noter que la première phase d'activation des caspases n'est pas reliée à la mort cellulaire, à l'inverse de la seconde qui est associée à l'apoptose du mégacaryocyte. Ceci signifie que la fonction de la caspase-3 dépend de sa localisation intracellulaire puisqu'elle entraîne l'apoptose lorsque sa distribution est homogène dans le cytosol, alors qu'elle joue un rôle dans la différenciation des plaquettes quand sa localisation est restreinte à certains compartiments cellulaires. Le mécanisme de formation des proplaquettes pourrait mimer les vésicules observées lors de l'apoptose (Mills et al., 1999). La formation des proplaquettes est associée à des changements majeurs du cytosquelette, incluant le clivage de la gelsoline, l'activation des microtubules (Radley and Scurfield, 1980), la polymérisation de l'actine et la phosphorylation de la myosine (Italiano et al., 1999). Au cours de ces phénomènes, les facteurs de transcription GATA-1 et NF-E2 ne sont pas clivés. Contrairement à l'érythropoïèse où les caspases colocalisent avec GATA-1, cette absence de clivage pourrait être due à une localisation différente des caspases au cours de la différenciation et de l'apoptose.

II.A.4.2. Rôle des caspases dans le système immunitaire et la réponse inflammatoire

L'activation des caspases n'est pas unique aux processus de différenciation hématopoïétique et a été retrouvée dans la régulation du système immunitaire.

La fonction des caspases lors de la réaction immunitaire innée est bien conservée au cours de l'évolution. L'étude de mutants de *C. elegans* dépourvus de ced-3 et ced-4 a permis d'observer que ces caspases seraient impliquées dans la défense immune contre des bactéries pathogènes (Aballay and Ausubel, 2001) ou l'inhibition de la réplication virale (Liu et al., 2006a). L'étude

chez la drosophile des mutants invalidés pour Dredd (équivalent orthologue de la caspase-8) a mis en évidence le rôle de cette protéine apoptotique dans l'immunité innée (Leulier et al., 2000).

II.A.4.2.1. Caspases et immunité innée chez les mammifères

Les premières données sur un rôle non apoptotique des caspases ont été la caractérisation initiale de la place de la caspase-1 dans la maturation de l'IL-1, en réponse à une infection bactérienne (Cerretti et al., 1992; Thornberry and Molineaux, 1995). Chez les mammifères, 2 types de complexe d'activation des caspases sont impliqués dans la régulation de l'immunité : le DISC après stimulation des récepteurs de mort et l'inflammasome, responsable de l'activation de l'IL-1.

La fixation d'une cytokine pro-inflammatoire, comme le TNF- α , à son récepteur entraîne la formation du complexe de signalisation DISC et l'activation de la caspase-8 dont les rôles dans la réponse inflammatoire comprendraient : l'activation de NF-KB, la différenciation des monocytes et la prolifération des lymphocytes T et B (Yi and Yuan, 2009). L'activation de NF-KB serait une réminiscence du rôle de Dredd chez la drosophile. La caspase-8 a été décrite comme étant associée au complexe IKB kinase (IKK) induisant l'activation de la transcription de NF-KB (Yi and Yuan, 2009).

Une sous-famille des caspases, incluant les caspases humaines -1, -4, -5 et murines -11 et -12 formant la sous-famille caspase-1, a été identifiée chez les vertébrés. Certaines de ces caspases peuvent être impliquées dans des processus apoptotiques mais leur principale fonction est la régulation de processus inflammatoires.

La caspase-1 a été initialement identifiée comme la protéase responsable de la maturation d'une cytokine multifonctionnelle : la pro-Interleukine 1 β en Interleukine 1 β (Cerretti et al., 1992). Il a ensuite été observé que les souris déficientes en caspase-11 avaient un phénotype remarquablement similaire aux souris déficientes en caspase-1 (Wang et al, 1998), avec un déficit en synthèse d'IL-1. Ceci suggérait que la caspase-11 était nécessaire à l'activation de la caspase-1 et à la maturation de l'IL-1 β (Wang et al., 1998). Il a ensuite été décrit un complexe multiprotéique appelé « inflammasome » comprenant les caspases-1 -5 et -11, ainsi que d'autres protéines adaptatrices (Martinon and Tschopp, 2004). La caspase-1 participerait également au processus de production d'IL-18 et d'IL-33 (Chowdhury et al., 2008) et à l'activation de NF-KB dans les lymphocytes B (Lamkanfi et al., 2004). Il a par ailleurs été récemment décrit que la caspase-1 serait impliquée dans un phénomène de sécrétion de protéines tel que le FGF-2, pro-IL-1 α ... Le mécanisme de cette sécrétion reste à déterminer ainsi que le rôle de la caspase-1, et des

protéines habituellement impliquées dans les phénomènes d'inflammation, de cytoprotection ou de réparation tissulaire (Keller et al., 2008).

II.A.4.2.2. Caspases et immunité adaptative chez les mammifères

Spécifique des vertébrés, l'immunité adaptative est caractérisée par sa spécificité pour les molécules étrangères et la capacité de « mémoire » pour certains microbes en prévision d'infections futures, de telle façon qu'une défense immunitaire forte se développe.

La place des caspases dans la régulation de l'immunité adaptative par élimination des cellules immunes activées ou auto-réactives, est bien établie. De façon surprenante, il a également été mis en évidence qu'un certain nombre de caspases joueraient des rôles positifs dans la réaction immunitaire adaptative en participant la prolifération et l'activation de lymphocytes.

De nombreuses études ont décrit le rôle essentiel de la caspase-8 dans la prolifération des cellules immunitaires (Su et al., 2005) (Salmena et al., 2003) (Chun et al., 2002) (Beisner et al., 2005). Les patients porteurs de mutations inactivatrices de la caspase-8 présentent un défaut dans l'activation des lymphocytes T, B et Natural Killer (Chun et al., 2002). De même les knock-out conditionnels de la caspase-8 dans les cellules T périphériques de souris inhibent leur prolifération après activation par le TCR (« T Cell Receptor ») (Salmena et al., 2003) Il a récemment été mis en évidence de façon surprenante que les lymphocytes T déficients pour la caspase-8 ou FADD pourraient proliférer normalement après une stimulation antigénique avant de mourir *via* la voie RIP1 kinase. Les lymphocytes T déficients en caspase-8 ont une activité RIP1 kinase augmentée. Il a ainsi été suggéré que le rôle de la caspase-8 serait de favoriser la survie des lymphocytes T activés en supprimant l'activité RIP1 kinase (Bell et al., 2008) (Ch'en et al., 2008) .

Les souris avec une délétion de la caspase-8 spécifiquement dans les lymphocytes B présentent un développement lymphocytaire B normal mais ont une réponse immunitaire humorale altérée (Lemmers et al., 2007).

Par ailleurs, la caspase-3 interviendrait dans le processus de maturation de l'IL-16 des cellules T (Wu et al., 1999a) . Les caspases sont impliquées dans l'activation lymphocytaire T et dans différentes voies de différenciation. L'activation de la caspase-3, sans apoptose, a été rapportée pour la première fois dans des lymphocytes T stimulés par la phytohémagglutinine (PHA) pendant les premières étapes de la prolifération lymphocytaire T (Miossec et al., 1997). Ces résultats ont ensuite été confirmés et il a été mis en évidence la participation de protéases de la famille de la caspases-3 dans l'activation lymphocytaire T après stimulation par des mitogènes et l'IL-2.

II.A.4.3. Rôles des caspases dans la prolifération cellulaire

Le maintien de l'homéostasie tissulaire après une lésion est une réponse essentielle pour la survie des métazoaires. Les phénomènes de régénération tissulaire associent les phénomènes de croissance et prolifération cellulaire à ceux de la mort cellulaire pour moduler les phénomènes de réparation.

Les caspases ont également été décrites comme jouant un rôle dans de nombreuses voies de la prolifération cellulaire.

Les caspases-1, -2, -8, et -10 ont été décrites capables d'activer NF-KB (Lamkanfi et al., 2007). Qui plus est, le clivage de PARP dans des conditions non apoptotiques par les caspases-3 et -7 participerait à l'amplification de l'expression des gènes régulés par NF-KB (Petrilli et al., 2004).

Les souris déficientes en caspase-8 présentent à plus long terme un phénotype mortel de lymphoprolifération et d'infiltration lymphocytaire caractérisées par des lymphadénopathies et splénomégalias (Salmena and Hakem, 2005) pouvant être comparées au phénotype des patients possédant la mutation pour la caspase-8 et présentant un ALPS de type II (Auto-immune Lympho Proliférative Syndrome). Ces patients succombent fréquemment à des infections microbiennes suite à leur incapacité à activer les lymphocytes NK, T, et B (Chun et al., 2002).

La caspase-8 n'est que faiblement activée dans les lymphocytes proliférants (Su et al., 2005) alors qu'elle est fortement activée lors de l'apoptose induite par Fas (Peter and Krammer, 2003). Cette voie de régulation complexe est régulée par c-FLIP_L au niveau du DISC (Tschopp et al., 1998) (Micheau et al., 2002). A de hautes concentrations de c-FLIP_L, le recrutement et l'activation de la caspase-8 par le DISC est fortement inhibée, bloquant ainsi l'induction de la mort cellulaire en favorisant l'activation de NF-KB *via* c-FLIP_L (Irmeler et al., 1997) (Chang et al., 2002).

La caspase-10 n'a pas d'équivalent chez la souris, mais pourrait compenser, chez l'homme, certaines fonctions spécifiques de la caspase-8 et expliquer la moindre sévérité du phénotype d'une mutation de la caspase-8 chez l'homme par rapport à la souris où elle est létale au stade embryonnaire. Il a également été décrit des patients porteurs d'une mutation ponctuelle de la caspase-10 ayant un défaut de l'activation de FasL et de TRAIL, aboutissant à l'accumulation de cellules lymphoïdes caractéristiques des ALPS de type II (Wang et al., 1999).

Il a également été décrit pour des caspases à prodomaine court et en particulier la caspase-3 des fonctions non-apoptotiques. La caspase-3 serait impliquée dans la régulation de la prolifération lymphocytaire B. Les souris déficientes en caspase-3 présentent des lymphadénopathies et une

splénomégalie due à une hyperprolifération lymphocytaire B et T (Woo et al., 2003). L'augmentation de la prolifération des lymphocytes T périphériques dans les souris déficientes en caspase-3 serait due à un défaut d'apoptose (Woo et al., 1998), alors que pour les cellules B, elle serait due à une altération de la régulation du cycle cellulaire (Woo et al., 2003). La localisation subcellulaire et la protéolyse de substrats associés à la régulation du cycle cellulaire suggèrent que la caspase-3 est impliquée dans la modulation de la croissance cellulaire. Dans les cellules lymphoïdes B proliférantes, le clivage par la caspase-3 de p27^{KIP1}, qui a un rôle d'inhibiteur de l'activité kinase des complexes cycline/CDK du cycle cellulaire, contribue à l'induction de la prolifération cellulaire (Frost et al., 2001a; Frost et al., 2001b). A l'inverse, l'hyperprolifération des lymphocytes B observée dans les souris invalidées pour la caspase-3 indique qu'elle jouerait un rôle dans la régulation négative du cycle cellulaire. Bien que l'inhibiteur de CDK, p21 soit un inhibiteur du cycle cellulaire, il peut aussi favoriser le cycle cellulaire en s'associant à PCNA (« Proliferating Cell Nuclear Antigen »). La protéine p21 est une cible de la caspase-3 qui le clive en C-terminal au niveau de son site de fixation à PCNA, expliquant son effet anti-prolifératif sur les lymphocytes B (Woo et al., 2003) (Gervais et al., 1998). Pendant la prolifération cellulaire compensatoire lors de processus de guérison tissulaire, la caspase-3 donne aux tissus leur forme et taille finale pour atteindre le nombre de cellules initial (Milan et al., 1997).

Dans un modèle de drosophile, il a été montré que les caspases pouvaient induire dans les mêmes cellules une combinaison paradoxale de signaux pro-apoptotiques ou pro-prolifératifs. Pendant le développement de la drosophile, l'induction de lésions de cellules du disque de formation des ailes active la caspase Dronc dont l'activité enzymatique induit la prolifération des cellules voisines pour restaurer les ailes (Huh et al., 2004) (James and Bryant, 1981). L'activation de processus de réparation induit après des phénomènes apoptotiques ont été décrits chez les mammifères ; elle pourrait refléter les propriétés primitives des caspases (Golpon et al., 2004).

II.A.4.4. Rôles des caspases dans la mobilité cellulaire

Un rôle des caspases a aussi été rapporté dans la **mobilité cellulaire** et la **migration**. La régulation de la migration cellulaire est une autre fonction non apoptotique émergente des caspases. L'inhibition de DRONC par DIAP a été décrite comme étant essentielle dans la migration des cellules bordantes des ovaires de drosophiles (Geisbrecht and Montell, 2004). La caspase-8 est impliquée dans des mécanismes de mobilité cellulaire (Helfer et al., 2006). Les souris « knock out » caspase-8 sont létales à un stade embryonnaire précoce, ce qui serait

principalement dû à une altération de la mise en place du système circulatoire, reflétant un défaut sous jacent de migration cellulaire (Varfolomeev et al., 1998).

Il a récemment été décrit que la caspase-11 jouerait un rôle dans la mobilité des cellules leucocytaires murines lors de l'inflammation, en régulant la dépolymérisation de l'actine (Li et al., 2007) (Yi and Yuan, 2009).

Au cours de ces dernières années, de nombreuses fonctions non apoptotiques des caspases ont été identifiées et l'on peut penser qu'il en reste encore beaucoup à découvrir. Une des questions clef de ces différents phénomènes est la détermination et la compréhension des mécanismes de sélectivité ou de protection des substrats des caspases activées. Ce travail de thèse porte sur les mécanismes de protection des substrats et en particulier de GATA-1, lors de la phase d'activation de la caspase-3 au cours de la différenciation érythroïde terminale.

II.A.5. Mécanismes de résistance à l'apoptose des cellules en cours de différenciation lors de la phase d'activation des caspases

Les fonctions non-apoptotiques des caspases montrent qu'elles peuvent être activées indépendamment ou sans induction de la cascade des caspases. Ainsi le clivage spécifique d'un sous-ensemble de substrats permet d'éviter la destruction de la cellule. Lors de processus de maturation de lignées cellulaires différentes, la sélectivité des protéines clivées par les caspases peut varier. Par exemple, lors de la différenciation des monocytes en macrophages, PARP et la Lamine B ne seront pas clivés, alors qu'ils le seront lors de la différenciation érythroïde terminale.

Les modèles présentés où les caspases jouent un rôle dans la différenciation posent tous le problème des mécanismes responsables de l'absence d'apoptose alors que les caspases sont activées. Plusieurs hypothèses peuvent être émises. Le taux d'activation des caspases pourrait être différent au cours de l'apoptose et de la différenciation et certains substrats pourraient avoir une plus forte affinité (clivage au cours de la différenciation) que d'autres (clivage au cours de l'apoptose). Cette hypothèse semble peu probable puisque dans la plupart des modèles, les taux d'activation des caspases ne semblent pas significativement différents entre différenciation et apoptose. Par exemple, le taux d'activation des caspases retrouvé dans les érythroblastes au cours de leur différenciation est comparable à ceux dont l'apoptose est déclenchée par privation en cytokines (Zermati et al., 2001). De même, le taux d'activation des caspases mesuré dans les lymphocytes T proliférants ou s'activant, est très nettement supérieur à celui observé dans des cellules tumorales en apoptose. Ceci suggère l'existence d'un mécanisme anti-apoptotique fort,

en aval de l'activation de la caspase-3, qui inhiberait une mort inappropriée et prématurée de ces cellules (Wilhelm et al., 1998).

Plusieurs mécanismes ont été décrits pour expliquer ces fonctions non apoptotiques des caspases :

- des modifications post-traductionnelles des caspases et de leurs substrats.

De façon intéressante, des modifications post-traductionnelles, y compris la phosphorylation et la S-nitrosylation, peuvent réguler directement l'activité caspase et influencer la mort cellulaire apoptotique (Allan et al., 2003) (Allan and Clarke, 2007) (Cardone et al., 1998) (Hess et al., 2005) (Nutt et al., 2005). La phosphorylation de la caspase-9 par Akt diminuerait son activité (Cardone et al., 1998). Une forme plus courte de FADD a été retrouvée dans des cellules T stimulées par des facteurs mitogènes, par rapport au FADD des lymphocytes T apoptotiques, après activation des récepteurs de mort (O'Reilly et al., 2004). Hsp27 (Hsp, « Heat shock protein ») interagirait avec le prodomaine de la caspase-3, inhiberait et modulerait son activation lors de l'induction de l'apoptose des monocytes (Voss et al., 2007). Le rôle de Raf *via* la cascade MEK/ERK dans les modifications des caspases ou de leurs cibles dans la différenciation érythroïde et des cellules du muscle squelettique reste à explorer (DeChant et al., 2002) (Kolbus et al., 2002) (Rubiolo et al., 2006).

La phosphorylation d'un résidu sérine adjacent au site de clivage par la caspase-3 protégerait la préséniline-2 (Walter et al., 1999).

- la compartimentalisation subcellulaire des protéases.

Bien que les caspases soient principalement localisées dans le cytosol, certaines d'entre elles ont été décrites comme pouvant être localisées dans certains organelles. Par exemple, dans certains modèles, la pro-caspase-3 a été identifiée dans la mitochondrie dans un complexe contenant Hsp60 et Hsp10 (Samali et al., 1998) (Samali et al., 1999) et la pro-caspase-2 dans le noyau et l'appareil de Golgi. La relocalisation des caspases induite par la différenciation est décrite dans un modèle de différenciation de lignée monocyttaire (Sordet et al., 2002a). Lors de la différenciation mégacaryocytaire, l'activation des caspases pourrait se situer dans différents compartiments subcellulaires et expliquer les différences entre apoptose et différenciation. Les mécanismes qui sous-tendent à ces différences de localisation ne sont actuellement pas connus (De Botton et al., 2002).

- *l'activation de facteurs anti-apoptotiques.*

La localisation subcellulaire de l'activité des caspases pourrait être fonction de celle d'inhibiteur comme les IAP qui bloqueraient de façon élective l'activation des caspases et protégeraient certaines cibles. Par exemple, lors de la différenciation de monocytes en macrophages, l'inhibiteur de caspases c-IAP1, est localisé dans le noyau des cellules non différenciées puis est transloqué dans l'appareil de Golgi au cours de la différenciation *via* un signal d'export nucléaire de type NES, pour réguler l'activation des caspases (Plenchette et al., 2004). Chez la drosophile, une autre IAP, dBRUCE est capable de protéger les spermatozoïdes en différenciation, de la mort par les caspases (Arama et al., 2003).

- *le recrutement de protéines antagonistes dans les plates-formes d'activation des caspases.*

Le recrutement de FLIP au niveau des complexes de mort semble moduler le niveau d'activation de la caspase-8 (Micheau et al., 2002).

- *la protection des cibles du clivage par les caspases, par interaction moléculaire avec d'autres protéines.*

Bcl-x_L est la principale protéine anti-apoptotique connue jusqu'ici comme étant impliquée dans l'érythropoïèse, en amont de la cascade d'activation des caspases en inhibant l'ouverture des pores mitochondriaux et ainsi la libération de molécules pro-apoptotiques (cytochrome c, Smac/DIABLO) de la mitochondrie vers le cytosol. Ainsi, l'expression de Bcl-x_L, ne peut pas expliquer la différence de protection spécifique de certains substrats des caspases entre les érythroblastes cultivés en présence d'Epo et ceux dont l'apoptose est induite par privation en Epo. Une autre hypothèse serait que des molécules anti-apoptotiques pourraient, en fonction de leur localisation cellulaire, agir sur la cible pour empêcher son clivage par les caspases. Ce modèle pourrait s'appliquer à l'érythropoïèse par l'intervention des protéines de choc thermique (Hsp).

Précédemment à ce travail de thèse, de façon très intéressante, il a été mis en évidence, grâce à des expériences de surexpression de la protéine Hsp70 dans la lignée tumorale WEHI-S, que l'action anti-apoptotique de Hsp70 contre la staurosporine peut s'exercer en aval de l'activation des caspases en bloquant la fragmentation de l'ADN (Jaattela et al., 1998). Dans ce modèle, comme dans les érythroblastes en cours de maturation, la caspase-3 est activée alors qu'il n'y a pas d'apoptose. Il y avait jusqu'à présent peu de données sur l'expression des protéines Hsp dans des modèles de différenciation hématopoïétique et dans

ce travail, nous avons cherché à comprendre par quels mécanismes GATA-1 est protégé de la caspase-3 activée lors de la différenciation érythroïde terminale. Nous avons émis l'hypothèse que la protéine Hsp70 pourrait agir en aval de la caspase-3 pour protéger les érythroblastes de l'apoptose.

II.B. Place de l'autophagie au cours de la différenciation érythroïde terminale

Les termes « mort cellulaire programmée » et « apoptose » ne sont pas des synonymes parce que la mort cellulaire observée au cours d'un phénomène physiologique peut ne pas avoir un aspect apoptotique (Baehrecke, 2002; Barkla and Gibson, 1999; Roach and Clarke, 2000). L'autophagie est la principale voie physiologique de la dégradation de macromolécules intracellulaires des cellules eucaryotes (Vercammen et al., 1998) (Chipuk and Green, 2005) (Figure C15). Ce processus intracellulaire joue un rôle clef dans le turnover des protéines à longue demi-vie, l'ARN, les macromolécules cytoplasmiques et aussi les organelles (Seglen et al., 1991) (Mortimore et al., 1989) (Mortimore et al., 1996). L'autophagocytose débute par la formation dans le cytosol d'une vésicule provenant du réticulum endoplasmique appelée phagophore et qui engloutit des organites et du cytoplasme. Cet autophagosome à double membrane fusionne avec le lysosome formant alors l'autophagolysosome, où ses constituants sont dégradés et recyclés (Mizushima et al., 2001). Les gènes impliqués dans l'autophagie chez les levures semblent avoir été conservés au cours de l'évolution mais le rôle de ces gènes dans le développement des vertébrés reste à déterminer. L'étude récente de modèles murins semblent indiquer que l'autophagie serait impliquée dans des réarrangements cytosoliques nécessaires à la prolifération, la mort et la différenciation durant l'embryogenèse et le développement post-natal (Cecconi and Levine, 2008).

Dès 1966, l'autophagie a été en fait le premier processus de mort cellulaire décrit au cours de la différenciation érythroïde (Kent et al., 1966). En effet, au cours de cette différenciation on assiste à une perte progressive des organelles et des protéines de la membrane plasmique. Il a été démontré qu'au cours de la maturation, alors que le nombre de mitochondries diminue, il y a une augmentation de la quantité d'organelles isolées dans des vacuoles à double membrane caractéristiques du processus d'autophagie (Takano-Ohmuro et al., 2000). Il a plusieurs fois été rapporté que l'autophagie participe à la dégradation des mitochondries au cours de l'érythropoïèse humaine ou murine (Kent et al., 1966) (Heynen et al., 1985). Et les vacuoles d'autophagie ont été observées dans les érythrocytes de différentes espèces de mammifères ainsi que dans les érythrocytes embryonnaires (Simpson and Kling, 1967) (Holm et al., 2002) (Koury et al., 2005).

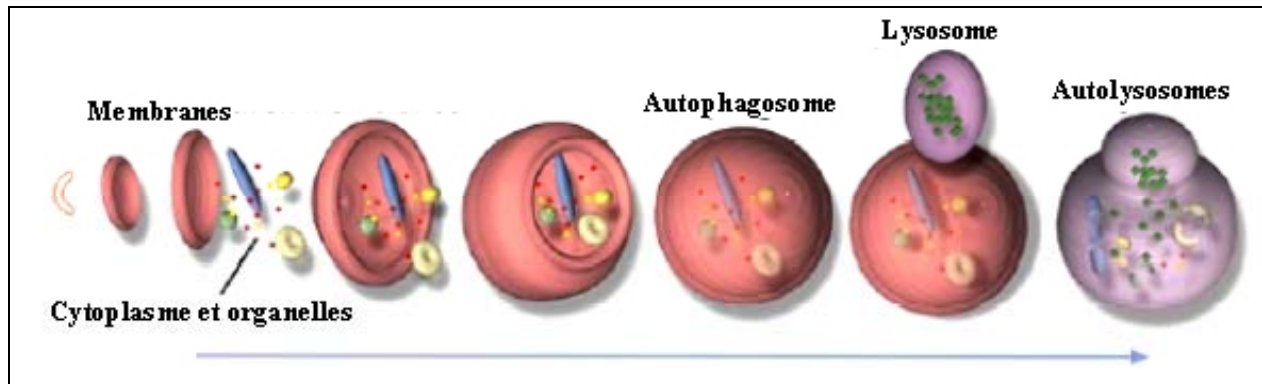


Figure C15 : L'autophagie chez les mammifères

(D'après Yoshimori, 2004)

La formation de vacuoles autophagiques (autophagosomes) résulte de la séquestration de portions du cytoplasme (incluant des organelles) à l'intérieur d'une vésicule pourvue d'une double membrane (en rose). Les autophagosomes fusionnent ensuite aux lysosomes (en violet), qui fournissent les hydrolases (en vert), pour former des autolysosomes.

Il est intéressant de noter que les patients splénectomisés, qui n'ont pas d'anomalie hématologique, peuvent présenter une augmentation du nombre d'érythrocytes contenant des autophagosomes. Ainsi, il semble que l'autophagie ait une place importante dans la différenciation érythroïde terminale. La famille des protéines Bcl2 est aussi impliquée dans la régulation de l'autophagie. Beclin 1, qui est une des protéines principales du processus d'autophagie, est inhibée par Bcl2 ou Bcl-x_L, ou au contraire activée quand ces dernières sont fixées par des protéines de la famille BH3. Récemment, un autre rôle d'une protéine BH3, Nix, a été décrit dans la régulation de l'autophagie des mitochondries. Au cours de la différenciation érythroïde, la dépolarisation mitochondriale est induite par Nix, ce qui conduit à la dépolarisation de la membrane mitochondriale et l'exposition de protéines qui seraient reconnues par les vésicules d'autophagie. Ainsi, seules les mitochondries dépolarisées seraient éliminées par autophagie (Sandoval et al., 2008) (Chen et al., 2008).

Ainsi, lors du processus de différenciation érythroïde terminale, plusieurs aspects de la mort cellulaire programmée comme l'activation des caspases et l'autophagie, sont impliqués et interagissent de façon coordonnée.

III. HSP70

III.A. Généralités sur les Heat Shock protéines

Les cellules de tous les organismes subissent continuellement une variété "de dégâts" liés aux modifications environnementales, à des facteurs physicochimiques aussi bien internes qu'externes. En conditions de stress, parmi les nombreux changements de l'activité et de la physiologie cellulaire, l'événement le plus remarquable est la production d'un ensemble de Hsp « Heat Shock Protein » également dénommées protéines de *stress*, formant une famille de protéines hautement conservées tout au long de l'évolution (Brocchieri et al., 2008). La réponse au choc thermique, découverte en 1962, chez des drosophiles exposées à une température sublétales, est caractérisée par la transcription préférentielle d'un petit nombre de gènes codant pour des protéines spécifiques (Ritossa, 1964).

Plus de dix années se sont écoulées entre la mise en évidence de l'accumulation des Hsp dans les cellules soumises à une hyperthermie et la découverte que ces protéines participaient à la solubilisation des agrégats protéiques induits par le *stress* et à leur reconformation après le *stress* (si celui-ci est sublétales).

Ces observations ont joué un rôle prépondérant dans l'établissement du concept de chaperons moléculaires. En 1989, Ellis *et al.* ont proposé que les chaperons moléculaires formaient une famille de protéines (incluant les Hsp) qui exercent des fonctions essentielles à la vie cellulaire et, plus encore, à la survie lors de *stress*, qu'ils soient physiques, chimiques ou métaboliques (Ellis et al., 1989). La présence de ces protéines à un niveau déjà important dans toute cellule en l'absence de *stress* a suggéré qu'elles participaient aussi au repliement normal des protéines. Le terme chaperon, d'origine française, fut proposé par John Ellis et Sean Hemmingsen pour désigner cette fonction d'assistance : *«Le terme "chaperon moléculaire" semble approprié parce que le rôle traditionnel d'un chaperon humain, décrit en termes biochimiques, est d'empêcher les interactions incorrectes entre surfaces potentiellement complémentaires et de rompre toute liaison incorrecte qui pourrait se former »* (Ritossa, 1964). Cette première définition délimite précisément le rôle des chaperons : favoriser le repliement correct des protéines, en évitant la formation d'agrégats entre les domaines hydrophobes normalement enfouis au sein de celles-ci mais qui deviennent accessibles dans le cas où des chaînes polypeptidiques sont partiellement repliées ou dénaturées (Morange, 2000).

Certaines des fonctions importantes de l'homéostasie cellulaire ont été attribuées aux Hsp:

- 1) ce que nous appellerons le « folding » qui comprend le bon repliement des protéines en structure fonctionnelle dès leur sortie du ribosome et la prévention de la formation et la dissolution d'agrégats protéiques (Garrido et al., 2001),
- 2) le transit des protéines vers un autre compartiment cellulaire ou organelle,
- 3) le repliement de protéines ayant une mauvaise conformation,
- 4) la participation à l'élimination des protéines dont les anomalies sont irréversibles,
- 5) le contrôle fonctionnel de protéines régulatrices. Les différentes Hsp exercent ces fonctions de chaperon dans des compartiments subcellulaires spécifiques au niveau desquels elles assurent, en coopérant les unes avec les autres, un «contrôle de qualité» et la protection cellulaire.

Ces fonctions impliquent que les Hsp interagissent avec une très grande variété de protéines cellulaires et constituent ainsi les composants importants des réseaux cellulaires (Csermely, 2004). Un autre rôle des Hsp est leur intervention dans les voies de l'apoptose. Les systèmes vivants ont donc développé une variété de stratégies pour réparer les dégâts et/ou éliminer les composants endommagés. Les liens entre la réponse au choc thermique, qui principalement répare les dégâts et l'apoptose, qui élimine les cellules endommagées, illustrent la nature fortement intriquée des voies de régulations dans les systèmes vivants.

Chez les mammifères, les Hsp ont été classées en 5 familles principales en fonction de leur poids moléculaire : Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, et les petites Hsp (15 à 30 kDa) incluant Hsp27. Chaque famille de Hsp est composée de membres qui sont exprimés, soit constitutivement, soit après induction et qui sont localisés dans différents compartiments subcellulaires. Par exemple Hsp60, Hsc70 (« Heat Shock Cognate 70 ») ou Hsp90 sont exprimées constitutivement dans les cellules de mammifères alors que, Hsp27 et Hsp70 sont fortement exprimées en condition de stress. Les cellules humaines contiennent plusieurs membres de la famille d'Hsp70 incluant : Hsp70 induite par le stress, Hsc70 exprimée constitutivement, Hsp75 mitochondriale et Grp78 localisée dans le réticulum endoplasmique (Jaattela, 1999). Avec Hsp27, Hsp70 est la protéine chaperonne la plus fortement inductible.

Les Hsp exprimées de façon constitutive sont impliquées dans l'homéostasie cellulaire et dans le folding protéique. Bien que leur expression doit être basse dans des conditions physiologiques pour permettre le bon déroulement des activités cellulaires (Qian et al., 2006), ces protéines sont

fortement induites par différents stress (Garrido et al., 2001). D'un point de vue physicochimique, Hsp70 et Hsc70 agissent de manière identique : elles ont donc une fonction unique, même si leurs cibles sont différentes *in vivo*. Le large spectre des fonctions cellulaires de protéines Hsp70 est dû à :

- 1) l'amplification et la diversification de gènes hsp70 dans l'évolution, qui a produit des chaperons Hsp70 spécialisés,
- 2) aux co-chaperons qui sont sélectivement recrutés par les chaperons Hsp70 pour accomplir des fonctions cellulaires spécifiques,
- 3) à la coopération des Hsp70 avec d'autres systèmes chaperons pour élargir leur spectre d'activité.

III.B. Phylogénie des Hsp70

Les Hsp représentent une famille de protéines hautement conservées, naturellement présentes dans toutes les cellules, des bactéries aux plus grands eucaryotes. En 1984, il a été démontré que la DnaK d'*Escherichia coli* et la protéine de choc thermique de 70 kDa de la Drosophile possèdent une séquence fortement conservée (Bardwell and Craig, 1984). Néanmoins, malgré leur lien historique, toutes les protéines de choc thermique ne sont pas des chaperons et tous les chaperons ne sont pas des protéines de choc thermique. De nombreux gènes d'hsp70 ont été décrits, aboutissant à une confusion dans les bases de données et dans la littérature. Récemment, l'étude des gènes des chaperonnes de la famille d'hsp70 a bénéficié du séquençage du génome humain et d'un nouveau protocole « chaperonomique » (Brocchieri et al., 2008). Ainsi, ont été identifiées 47 séquences d'hsp70 humain, 17 gènes codant pour les protéines de la famille Hsp70 et 30 pseudogènes (Tableau H1). Cette étude « chaperonomique » accroît considérablement le nombre de 11 gènes résultant de la précédente tentative de classification "pré-génomique" (Tavaria et al., 1996) et réduit une liste récente de 21 gènes putatifs (Wada et al., 2006) rassemblés selon les résultats de bases de données et qui incluent quatre séquences de pseudogènes (Brocchieri et al., 2008). Trente autres séquences appartenant à la famille des gènes d'hsp70 mais ayant des caractéristiques de pseudogènes, ont également été identifiées (Brocchieri et al., 2008).

Malgré leur grande diversité, les Hsp70 humaines peuvent être triées en différents groupes d'évolution. Les arbres phylogénétiques des gènes hsp70 humains ont été calculés sur la base de l'alignement de leurs produits protéiques. L'analyse phylogénétique des protéines codées par les 17 gènes d'hsp70 a permis de distinguer sept groupes d'évolution majeurs (Figure H1).

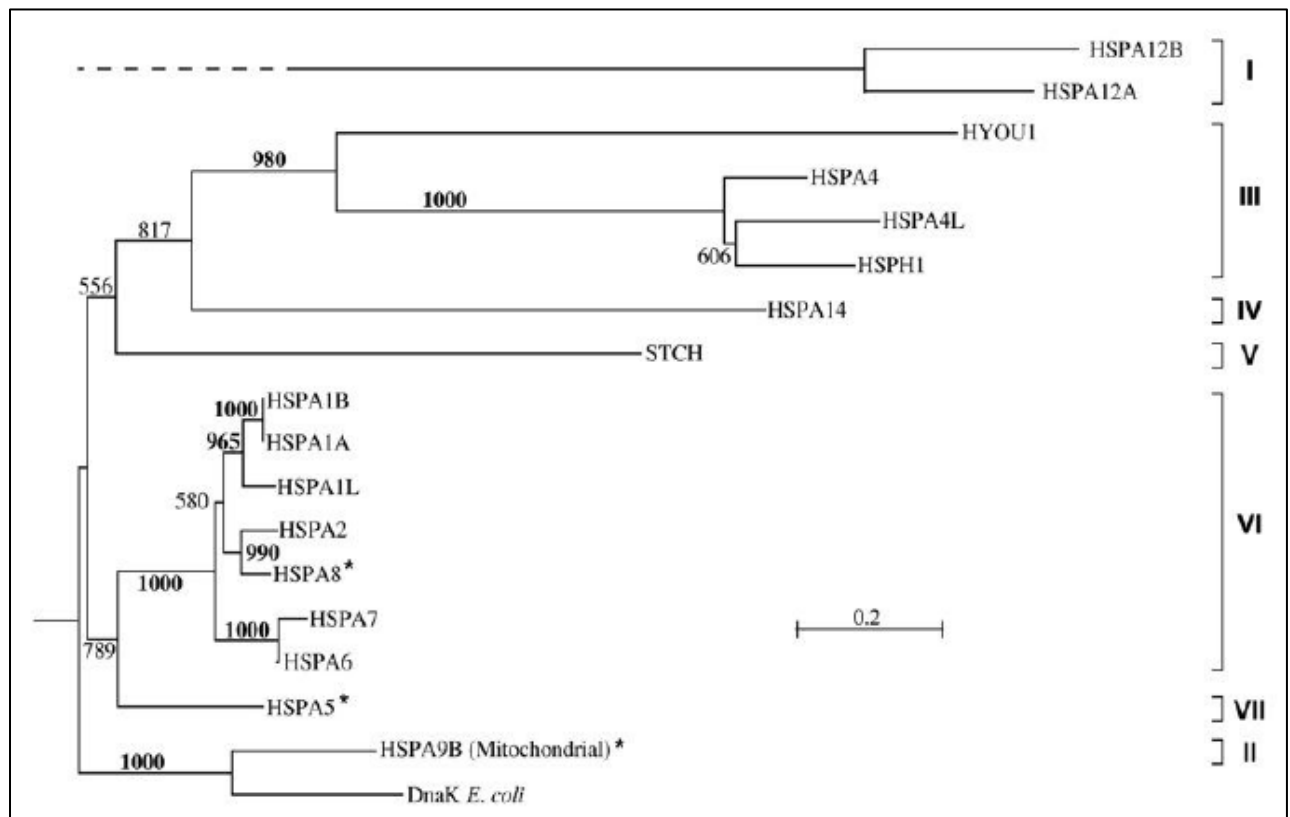


Figure H1 : Arbre phylogénétique des 17 protéines Hsp70 humaines

(Tiré de Brocchieri, 2008)

L'analyse phylogénétique des protéines codées par les 17 gènes d'hsp70 humains a permis de distinguer sept groupes d'évolution majeurs (I,II, III...). Ces groupes ont été établis en fonction de la présence de « séquences signatures », de la structure exon-intron des gènes, et sont également corrélés à d'autres données (poids moléculaire,localisation cellulaire...).

Nom/ID	Localisation	nt	aa	Ex	Is
Hsp70kDa 6 (HSP70B') / HSPA6	1q23.3	1929	643	1	1
Hsp70kDa 7 (HSP70B) / HSPA7	1q23.3	1924	641	1	1
Hsp70kDa 4-like / HSPA4L	4q28.1	50321	839	19	1
Hsp70kDa 9B / HSPA9B	5q31.2	19279	679	17	1
Hsp70kDa 4 / HSPA4	5q31.1	52183 52183	840 148	19 5	a b
Hsp70kDa 1-like / HSPA1L (HSP70-Hom)	6p21.33	1923	641	1	1
Hsp70kDa 1A / HSPA1A (HSP70-1)	6p21.33	1923	641	1	1
Hsp70kDa 1B / HSPA1B (HSP70-2)	6p21.32	1923	641	1	1
Hsp70kDa 5 (Grp78) / HSPA5	9q33.3	4532	654	8	1
Hsp70kDa 12A / HSPA12A	10q25.3	32503	675	12	1
Hsp70kDa 14 / HSPA14	10p13	33201 3774	509 88	14 4	1 2
Hsp70kDa 8 / HSPA8	11q24.1	3588 3588	646 493	8 7	1 2
150kDa oxygen-regulated protein / HYOU	11q23.3	10565 10565 10234 7143	999 999 964 687	25 25 24 16	1 1 2 3
Hsp105kDa / HSPH1	13q12.3	24262 24262	858 814	18 17	α β
Hsp70kDa 2 / HSPA2	14q23.3	1917	639	1	1
Hsp70kDa 12B / HSPA12B	20p13	13489	686	12	1
Stress 70 protein chaperone / STCH	21q11.2	9500	471	5	1

Tableau H1 : Principales caractéristiques des gènes hsp70 dans le génome humain

(Tiré de Brocchieri, 2008)

Abréviations et symboles : Nom/ID : noms couramment utilisés; nt : nombre de nucléotides entre le Début et la Fin ; aa : nombre d'acides aminés de la protéine produite ; Ex : Exons (exons non codants exclus) ; Is : Isoformes.

Ces groupes ont été établis en fonction de la présence de « séquences signatures » caractéristiques (séquence présente dans un groupe et absente des autres), de la structure exon-intron des gènes, et sont également corrélés à d'autres données (comme par exemple, leur poids moléculaire ou leur localisation cellulaire) (Brocchieri et al., 2008). Les principales caractéristiques des 17 gènes hsp70 sont illustrées dans le Tableau H1.

Les protéines Hsp70 typiques comprennent deux domaines majeurs : - un domaine de fixation de l'ATP (ABD) (ATPase Binding Domain) - et un domaine de fixation des substrats peptidiques (PBD) (« Peptid Binding Domain »). La comparaison des séquences et des domaines a permis de mettre en évidence que la famille Hsp70 est définie par son domaine ABD, conservé pour tous ses membres (Brocchieri et al., 2008). En revanche, la structure du domaine PBD est très variable dans les différents groupes de Hsp70 (Figure H2). Les séquences des Groupes II (mitochondrial), VI (cytosolique/nucléaire) et VII (réticulum endoplasmique) des protéines Hsp70 sont considérées comme typiques ou classiques car les sites de fixation ABD et PBD sont conservés (Brocchieri et al., 2008). Les séquences de tous les autres groupes sont considérés comme atypiques parce qu'elles ne possèdent pas un site PBD classique. La substitution, ou la perte du domaine PBD, suggère que les protéines de la famille Hsp70 appartenant aux Groupes I, III, IV et V ont probablement développé des structures et des fonctions du domaine PBD qui ne sont pas nécessairement associées au mécanisme classique de reconnaissance des peptides hydrophobes, qui est le mécanisme de reconnaissance des séquences Hsp70 typiques des Groupes II, VI et VII. Le groupe VI est composé de séquences où ont été distingués trois sous-groupes, un incluant HSPA1A, HSPA1B et HSPA1L, un second incluant HSPA8 et HSPA2 et un troisième incluant HSPA6 et HSPA7 (Brocchieri et al., 2008).

La principale protéine de stress-inductible chez l'homme, qui fait l'objet de cette thèse, est Hsp70A et fait partie du groupe VI. Il existe deux gènes inductibles qui codent des protéines identiques ou presque identiques de 641 acides aminés (Brocchieri et al., 2008). Ces protéines sont Hsp70A1 et Hsp70A2 et les gènes correspondant sont respectivement HSPA1A et HSPA1B. HSPA1A et HSPA1B sont des gènes répétés en tandem qui se trouvent dans la région III du Complexe Majeur d'Histocompatibilité, sur le bras court du chromosome 6 (6p21.3), avec leur terminaison 5' proche de l'extrémité télomérique. Les gènes HSPA1A et HSPA1B font 12 kb chacun, couvrent 2386bp (bp, paires de bases) et 2459bp respectivement et sont dépourvus d'intron. La séquence très semblable des protéines codées par HSPA1A et HSPA1B indique qu'il

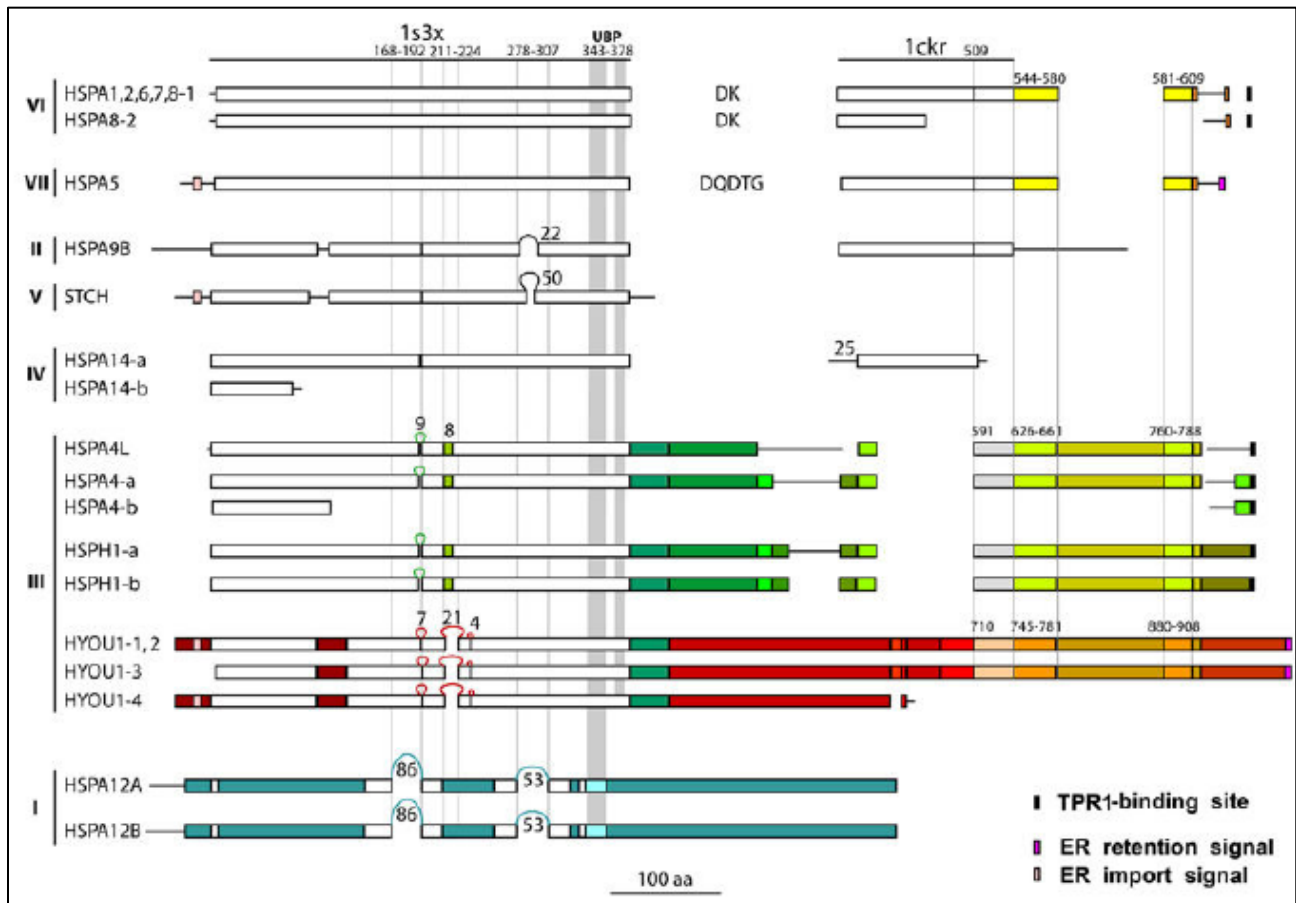


Figure H2 : Classification et caractéristiques structurale des protéines Hsp70 humaines

(Tiré de Brocchieri, 2008)

Les protéines Hsp70 « typiques » comprennent deux domaines majeurs: -un domaine ABD (« ATPase » Binding Domain) -et un domaine PBD (« Peptid Binding Domain »). Les séquences des Groupes II (mitochondrial), VI (cytosolique/nucléaire) et VII (réticulum endoplasmique) des protéines Hsp70 sont considérées comme typiques ou classiques car les sites de fixation ABD et PBD sont conservés.

Un domaine UBP (« Ubiquitin Binding Peptid ») a été identifié dans la plupart des séquences Hsp70 suggérant que toutes les protéines Hsp70 dites « classiques » et la majorité des autres dites « atypiques » sont impliquées dans le système ubiquitine-protéasome et la voie de dégradation des protéines.

y a probablement eu un événement de duplication de gènes suivi par des changements de séquence nucléotidique dans le temps (Brocchieri et al., 2008).

Les protéines Hsp70 forment une famille de molécules qui ont acquis leur diversité à différents niveaux : génétique, transcriptionnel et post-transcriptionnel. Au niveau transcriptionnel, il semble que les gènes de la famille hsp70 aient beaucoup de transcripts et de protéines variantes qui peuvent être exprimés dans des cellules humaines. Cela suggère que des variations de l'expression de gène, par différents sites d'initiation de transcription et/ou sites d'initiation de traduction ou d'épissage alternatif, puissent être un phénomène plus important que précédemment envisagé dans l'acquisition de nombreuses propriétés fonctionnelles de la famille Hsp70 dans les différents tissus et les compartiments cellulaires (Brocchieri et al., 2008). Les isoformes des protéines montrés dans le Tableau H1 appartiennent, dans la majorité des cas connus, à des variants d'ARNm. Pour HspA1A/B, il est référencé sur la base de données RefSeq un transcript représentatif (NM 005345), mais l'analyse des séquences d'ADN complémentaire d'Homosapiens, a mis en évidence au moins 6 variants d'épissage (Brocchieri et al., 2008).

III.C. Régulation de la synthèse d'Hsp70

Le choc thermique provoque l'arrêt de la transcription de la grande majorité des gènes d'une cellule, cependant, dans ces conditions, certaines parties de la chromatine témoignent d'une intense activité transcriptionnelle (Ritossa, 1964) (Tissieres et al., 1974). Ces parties de chromatine correspondent aux gènes des protéines de stress et notamment aux gènes des Hsp. Cette famille de protéines intervient dans la régulation de plusieurs voies de signalisation qui conduisent à la survie ou à la mort des cellules. La surexpression d'Hsp70 permet d'empêcher la mort cellulaire déclenchée par divers stimuli qui induisent par eux-mêmes une forte expression d'Hsp70, fournissant un exemple de mécanisme par lequel des stimuli pro-apoptotiques, délivrés au-dessous d'un certain seuil, peuvent induire une réponse protectrice contre la mort cellulaire (Gorman et al., 2005). Ainsi, un taux élevé d'Hsp n'est pas restreint à la période de stress proprement dite, mais peut durer plusieurs heures ou jours après le stress (période de récupération après le stress), produisant ainsi un état transitoire de tolérance au stress (exemple de la thermotolérance dans le cas d'un choc thermique).

Les Hsp sont aussi exprimées en absence de stress, soit de façon constitutive dépendante du cycle cellulaire, soit au cours du développement et de la différenciation cellulaire (Lindquist, 1986). A travers leur fonction protectrice, les Hsp apparaissent comme des protéines jouant un rôle clef dans les cellules dans des conditions de stress ou physiologiques.

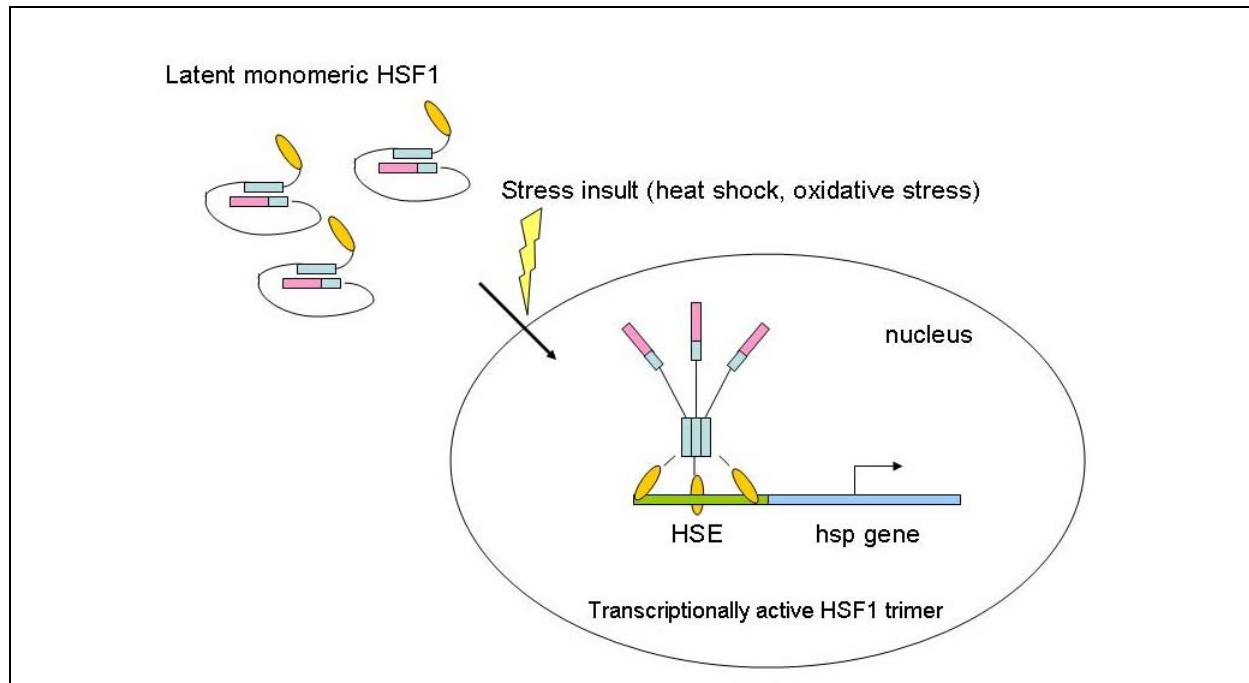


Figure H3 : Induction de la synthèse d'Hsp par HSF

(Tiré de www.umich.edu)

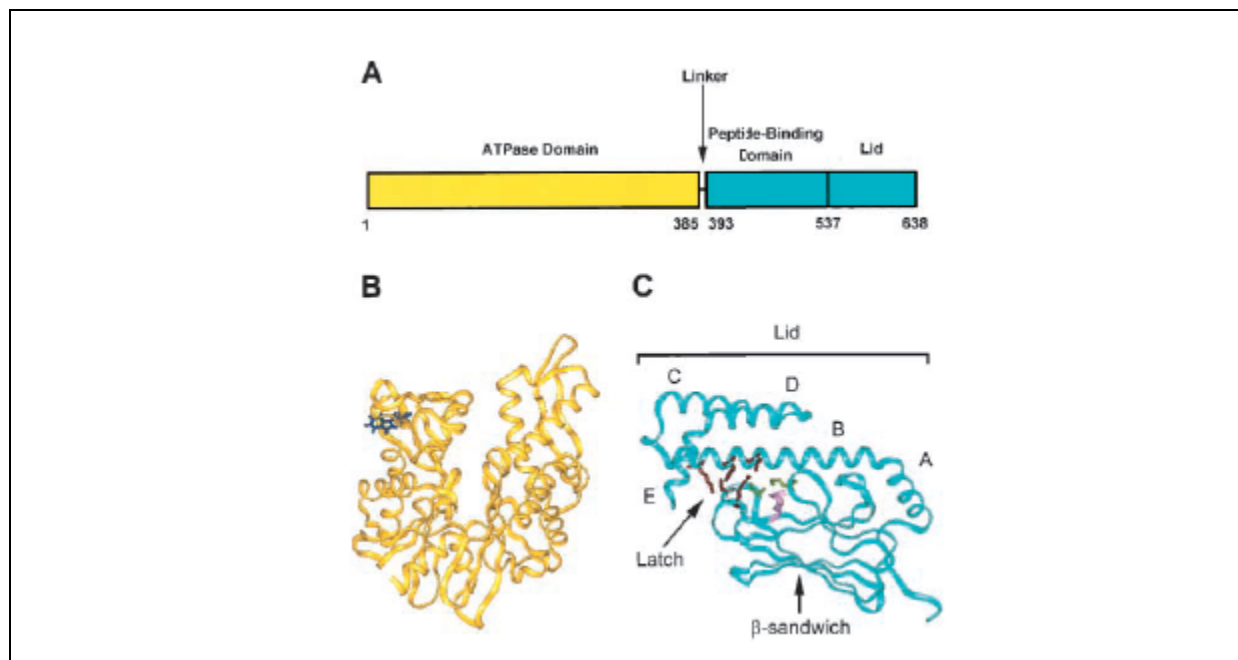
La réponse cellulaire au stress correspond à l'activation de facteurs de transcription bien déterminés : les HSF (« Heat Shock Factors ») qui se lient aux séquences consensus spécifiques HSE (« Heat Shock Element ») des régions régulatrices des gènes codants les Hsp.

En condition basale, les HSF sont sous forme monomérique dans le cytosol. En condition de « stress », les HSF s'activent après oligomérisation, puis migrent dans le noyau et se fixent sur les sites HSE.

De nombreux membres de la famille HSF ont été décrits. HSF2 est exprimé et activé constitutivement au cours des processus de différenciation cellulaire comme l'embryogenèse et la spermatogenèse chez la souris et lors de l'induction de la différenciation érythroïde de cellules K562 par l'hémine.

La réponse au stress correspond à l'activation de facteurs de transcription bien déterminés : les HSF (Heat Shock Factors). Ces HSF se lient à des séquences consensus spécifiques : les HSE (Heat Shock Element), localisés dans les régions régulatrices des gènes « heat shock » codants les Hsp. Les HSE comportent au moins trois motifs 5'-nGAAn-3' en répétition inversée (Schiller et al., 1988). Depuis la mise en évidence de l'unique gène d'HSF chez *Saccharomyces cerevisiae* (Wiederrecht et al., 1988) et *Drosophila melanogaster* (Clos et al., 1990), de nombreux membres de la famille des HSF ont été décrits chez les vertébrés (HSF1, HSF2, HSF3 et HSF4) et chez les végétaux (Morano and Thiele, 1999) (Nakai et al., 1997) (Nover et al., 1996) (Wu, 1995). L'existence de multiples copies de ces facteurs de transcription chez ces organismes vivants suggère que différents HSF induisent des réponses à des stimuli physiologiques ou environnementaux variés (Leppa et al., 1997). Les HSF s'activent après oligomérisation puis se fixent sur les sites HSE. HSF1 est l'homologue fonctionnel de l'HSF général qui est activé en réponse à divers types de stress, comme une élévation de la température ou une exposition à des métaux lourds (Sorger et al., 1987) (Amin et al., 1988) (Mosser et al., 1988) (Baler et al., 1993) (Sarge et al., 1993). La grande diversité des inducteurs de la réponse au stress peut s'expliquer par le fait qu'ils agissent en déstabilisant le repliement des protéines ou en détruisant des structures protéiques déjà établies. Une observation clé dans ce domaine a été celle de la néosynthèse des Hsp lors de la micro-injection de protéines dénaturées dans des cellules (Ananthan et al., 1986) ou de l'incubation des cellules avec des analogues d'acides aminés. Il est probable que HSF1 soit activé par la présence de protéines ayant subi, pour une raison ou pour une autre, des dégradations et présentant à leur surface des zones hydrophobes (Morimoto, 1998) (Figure H3).

Une des différences fondamentales entre HSF1 et HSF2 est qu'ils répondent à des signaux différents. Lors de son activation, HSF1 se transforme rapidement en trimère, est hyperphosphorylé puis transloqué au noyau (Rabindran et al., 1993) (Baler et al., 1993) (Sarge et al., 1993) (Westwood et al., 1991). Contrairement à HSF1, HSF2 n'est pas activé lors d'un stress aigu mais est exprimé et activé constitutivement au cours de l'embryogenèse et la spermatogenèse chez la souris (Mezger et al., 1994) (Murphy et al., 1994) (Sarge et al., 1994), et lors de l'induction de la différenciation érythroïde de cellules K562 par l'hémine (Leppa et al., 1997). Cette activation de HSF2 semble essentielle à la différenciation érythroïde des K562 (Leppa et al., 1997) puisqu'il a été suggéré que, comme l'expression de la globine, l'activation d'HSF2 et la synthèse d'Hsp70 seraient induites directement ou indirectement par l'hémine.



**Figure H4 : Conformation structurelle des domaines ABD et PBD de DnaK
(équivalent d'Hsp70 chez *E. Coli*)**

(Tiré de Slepnev et al, 2002)

- A. Caractéristiques des domaines de DnaK
- B. Structure du domaine ABD en N-Terminal de DnaK qui est définie par une cavité centrale localisée entre deux lobes où se fixent les nucléotides ATP ou ADP
- C. Structure du domaine PBD en C-Terminal de DnaK qui est composé d'un sous-domaine en β -sandwich de 15 kDa et d'un sous-domaine « couvercle » composé de 5 hélice- α (A à E) en C-terminal. Le peptide fixé au domaine PBD interagit avec une poche hydrophobe profonde du domaine en β -sandwich mais pas avec le couvercle.

HSF2 serait ainsi impliqué dans la différenciation érythroïde terminale. Ces résultats ont confirmé l'étude où il avait été mis en évidence que l'expression d'Hsp70 était induite dans les cellules K562 par l'hémine (Singh and Yu, 1984). Les mêmes auteurs avaient d'ailleurs remarqué, dans la moelle osseuse, l'expression d'Hsp70 et plus particulièrement dans les érythroblastes matures et non pas dans les érythrocytes (Singh and Yu, 1984). Il a ensuite été décrit, dans ce modèle de différenciation érythroïde de la lignée K562, qu'il existait en fait 2 isoformes d'HSF2 : HSF2- α et HSF2- β ayant des fonctions distinctes. HSF2- α possède un potentiel activateur de la différenciation induite par l'hémine, alors que l'isoforme β réprime l'expression d'Hsp70. L'hyperexpression d'HSF2- β diminue l'expression de la globine et il a été suggéré qu'elle inhiberait la différenciation érythroïde des cellules K562 (Leppa et al., 1997).

En plus des sites HSE, plusieurs séquences régulatrices agissant en cis, incluant les sites pour Sp1 et c-myc, ont été retrouvées dans la région promotrice du gène hsp70 (Banerji et al., 1987) (Taira et al., 1999). Il a également été décrit dans les cellules de la lignée K562, une séquence GATA dans cette région. La lignée K562, où l'expression d'Hsp70 est très abondante, dérive de cellules de leucémie myéloïde chronique résultant de la translocation chromosomique t(9,22) qui est à l'origine de l'expression de la protéine de fusion Bcr-Abl. Dans ces cellules, la synthèse d'Hsp70 est coordonnée par Bcr-Abl et GATA-1 *via* la séquence GATA. L'inhibition de l'expression d'Hsp70 dans les cellules K562 chimiorésistantes permet de rétablir la chimiosensibilité (Ray et al., 2004) (Pocaly et al., 2007). Il a par ailleurs été récemment mis en évidence chez le protozoaire cilié *Tetrahymena thermophila* (*T. thermophila*) un motif GATA associé au site HSE de la région promotrice du gène d'Hsp70-1. Dans *T. thermophila* l'association des motifs GATA et HSE est nécessaire pour l'induction de transcription d'Hsp70-1 (Barchetta et al., 2008). Des motifs GATA avaient déjà été décrits dans des promoteurs de gène de stress, comme par exemple, dans les gènes metallothionéines mtl-1 et mtl-2 de *C. elegans* (Moilanen et al., 1999) et dans le gène metallothionéine MTT1 de *T. thermophila* (Dondero et al., 2004).

Les taux d'Hsp70 et Hsp27 sont élevés dans de nombreux cancers et sont tumorigènes du fait de leurs propriétés anti-apoptotiques (Garrido et al., 2006a). La transcription de ces gènes dans les cancers est en partie régulée par les protéines répresseurs de tumeur p53 et p63 (Calderwood and Ciocca, 2008) . Ces protéines inhibent la transcription d'Hsp70 *via* des sites de fixations de facteurs de transcription présents dans les régions promotrices du gène hsp70 (Calderwood and Ciocca, 2008). L'acquisition de mutations de p53 ou de p63 lors du processus oncogénique

(anomalie génétique acquise associée à plus de 45% des cancers), inhibe cet effet répresseur sur les promoteurs d'Hsp70 et induit l'augmentation de sa synthèse.

III.D. Structure d'Hsp70

Comme d'autres Hsp, Hsp70 comporte deux régions (Carrello et al., 2004) fonctionnelles distinctes : un domaine de 45 kDa ABD de fixation de l'ATP en N-terminal nécessaire à sa fonction de chaperon moléculaire et un domaine PBD C-terminal de 25 kDa environ, responsable de la fixation des substrats et de leur folding (Figure H4A) (Slepenkov and Witt, 2002). La structure d'ABD (Figure H4B) est définie par une cavité centrale localisée entre deux lobes où se fixent les nucléotides ATP ou ADP (Flaherty et al., 1990) (Harrison et al., 1997). Le domaine PBD est composé d'un sous-domaine en β -sandwich de 15 kDa et d'un sous-domaine « couvercle » en hélice- α en C-terminal (Figure H4C) (Morshauser et al., 1995; Zhu et al., 1996). Le peptide fixé au domaine PBD interagit avec une poche hydrophobe profonde du domaine en β -sandwich mais pas avec le couvercle. L'état ouvert/fermé du domaine PBD est obtenu par le repositionnement d'un couvercle en hélice α sur la poche de fixation du substrat, qui est induit par le statut du domaine ATPase et la fixation d'un nucléotide (Slepenkov and Witt, 2002) (Garrido et al., 2006a). En effet, lorsque de l'ATP est fixé à l'ABD, Hsp70 se trouve dans un état de faible affinité ce qui a pour conséquence une libération de son substrat, alors que lorsque l'ADP est lié à l'ABD, Hsp70 est dans un état de forte affinité permettant la fixation de la protéine-cible (Mayer and Bukau, 2005) (Figure H5).

III.E. Propriétés d'Hsp70

III.E.1. Folding

Le dogme de la biologie moléculaire selon lequel la structure finale d'une protéine ne dépendait que de l'enchaînement de ses acides aminés, avait fait oublier que rien ne s'opposait à ce que ce repliement soit néanmoins assisté et « protégé » (Morange, 2000). En 1973, Anfinsen a décrit un principe biochimique central selon lequel la structure primaire d'une protéine définit sa structure tridimensionnelle en montrant que la RNase A non pliée acquiert spontanément *in vitro* sa conformation active (Anfinsen, 1973). En règle générale, de telles expériences *in vitro* sont faites en utilisant des protéines de petites tailles, à de faibles concentrations, dans des conditions optimales de milieu physico-chimiques. Mais même dans ces conditions idéales, il est difficile d'atteindre 100 % d'efficacité de repliement à cause des phénomènes de mauvaise conformation et d'agrégation (Slepenkov and Witt, 2002). Dans les cellules vivantes, les conditions de repliement des protéines sont loin d'être idéales et des phénomènes d'agrégation protéique sont

observés dans toute cellule en conditions normales et sont fortement augmentés par le stress aigu ou chronique ou par la présence d'une mutation modifiant la séquence d'une protéine. Ceci aboutit à la synthèse de protéines dont la conformation est altérée, à la formation d'agrégat de protéines ou à la dislocation de complexes protéiques. Les molécules chaperonnes permettent de rétablir l'homéostasie des protéines, de dissocier des agrégats protéiques «physiologiques» ou induits par le stress et participent ainsi au cycle fonctionnel de ces molécules (Slepenkov and Witt, 2002) (Morange, 2000). Nous nommerons cette propriété chaperonne de restauration protéique « folding ».

Les protéines Hsp70 sont les éléments centraux du réseau cellulaire comprenant des chaperons moléculaires et des catalyseurs du folding. Elles sont les composants essentiels des processus de folding et interagissent avec des régulateurs clefs de nombreuses voies de transduction du signal contrôlant l'homéostasie cellulaire, la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire. Pour les protéines nouvellement synthétisées (dites natives), les protéines Hsp70 exercent ces activités de chaperon moléculaire dans le contrôle de qualité et le folding co- et post-traductionnel. Le rôle de Hsp70 dans le folding des protéines non natives peut être divisé en trois activités reliées entre elles : prévention de la formation d'agrégat, rétablissement dans leur état de synthèse initiale et solubilisation/reconformation des protéines. En condition de stress, l'augmentation de l'expression d'Hsp70 permet aux cellules de faire face à l'augmentation de la concentration de protéines mal repliées ou dénaturées (Nollen et al., 1999) (Garrido et al., 2006a).

Le mécanisme de folding des protéines semble être basé sur la propriété de Hsp70, contrôlée par l'ATP (Parsell and Lindquist, 1993), d'associer transitoirement leur domaine PBD de liaison au substrat avec de courts segments peptidiques hydrophobes des protéines. Une protéine mal repliée expose à sa surface de courtes séquences formées d'acides aminés hydrophobes (aliphatiques ou aromatiques) qui correspondent normalement au cœur hydrophobe de la protéine. La protéine chaperonne se lie à ces résidus, formant un complexe avec la protéine dénaturée. Progressivement, la protéine chaperonne se fixe au squelette de la chaîne polypeptidique pour induire sa reconformation (Slepenkov and Witt, 2002).

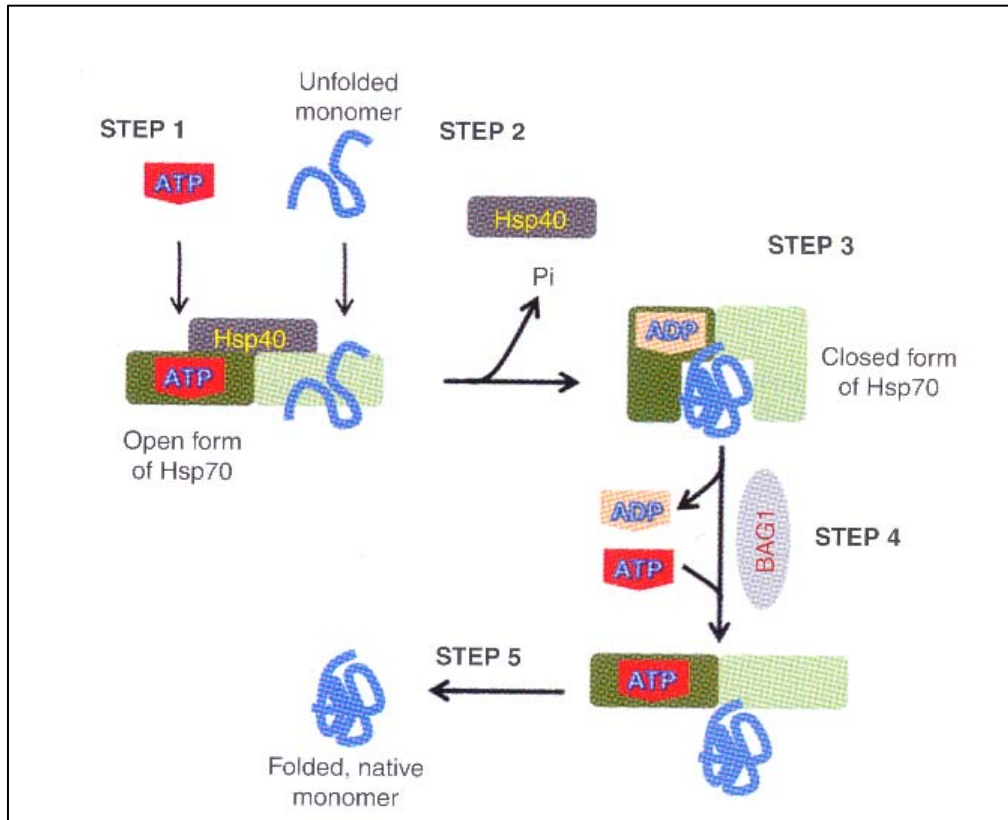


Figure H5 : Différentes étapes de « folding » d'une chaîne polypeptidique, par Hsp70

(Tiré de Ellis, 2008)

Etape 1 : Fixation de l'ATP sur le domaine ABD d'Hsp70 alors que le polypeptide se fixe sur le domaine PBD.

Etape 2 : La molécule co-chaperone Hsp40 se fixe à Hsp70 et stimule l'hydrolyse de l'ATP fixé en ADP qui se dissocie ensuite d'Hsp70.

Etape 3 : L'hydrolyse de l'ATP induit un changement de conformation d'Hsp70 en une forme « fermée » ce qui bloque la chaîne polypeptidique.

Etape 4 : La protéine co-chaperone Bag1 se fixe à Hsp70 et stimule le remplacement de l'ADP par l'ATP ce qui induit le retour d'Hsp70 à une forme « ouverte ».

Etape 5 : Le polypeptide ayant acquis une bonne conformation est ensuite libéré d'Hsp70.

Des cycles répétés de modifications de conformation de la protéine chaperonne avec fixation/libération des substrats, contrôlés par la fixation de l'ATP et son hydrolyse, provoquent une alternance d'environnements hydrophiles et hydrophobes, un dépliement partiel à chaque cycle de la protéine (Shtilerman et al., 1999) et induisent la solubilisation des agrégats, la mise en forme, l'assemblage, la translocation et la protéolyse des protéines dans les cellules (Bukau and Horwich, 1998) (Ellis and Hartl, 1999) (Agashe and Hartl, 2000; Slepnev and Witt, 2002) (Figure H5). Indépendamment de ce processus, les molécules d'Hsp70 ne communiquent aucune information stérique qui influence la conformation de la protéine substrat : toutes les informations nécessaires à sa forme finale sont en effet incorporées dans la séquence de la protéine.

L'activité chaperonne d'Hsp70 est régulée par des co-chaperonnes qui, soit stimulent l'hydrolyse de l'ATP fixé à Hsp70 (comme les membres de la famille des protéines à domaine J (DnaJ/Hsp40)), ou soit stimulent la dissociation de l'ADP qui précède la fixation d'ATP et la libération du substrat (comme les cochaperones appelées NEF (« Nucleotid Exchange Factor »), par exemple. GrpE/Bag1) (Harrison et al., 1997) (Brehmer et al., 2001) (Goloubinoff and De Los Rios, 2007). (Figure H5)

III.E.2. Hsp et protéolyse

Les risques liés aux protéines dont le repliement est altéré sont contrôlés par deux mécanismes : les chaperons moléculaires qui facilitent le repliement approprié des protéines et le système ubiquitine-protéasome qui régit la dégradation de protéines altérées. Le dogme est que des chaperons comme les Hsp et le système ubiquitine/protéasome travaillent de façon compétitive dans la dégradation sélective des protéines de structure endommagée ou incorrecte (Shi and Thomas, 1992). L'ubiquitine, dont la production est stimulée par un stress thermique, peut être considérée comme une protéine de choc thermique malgré son absence apparente d'activité chaperon de reconformation protéique. Cependant, les Hsp n'ont pas seulement un rôle compétitif vis-à-vis de la dégradation protéasomale des protéines mais peuvent aussi avoir l'effet opposé et favoriser la dégradation de protéines sélectionnées (Garrido and Solary, 2003). Le système d'ubiquitylation marque les protéines à dégrader par le protéasome, un complexe protéasique composé de 2 sous-unités. De nombreuses données lient le système protéasome et les Hsp. Il a été identifié dans la plupart des séquences Hsp70 un domaine de fixation de peptide ubiquitinilé nommé UBP (« Ubiquitin Binding Peptid ») (Figure H2) (Kaye et al., 2000), suggérant que toutes les protéines Hsp70 dites « classiques » et la majorité des autres dites « atypiques » sont

impliquées dans le système ubiquitine-protéasome et la voie de dégradation des protéines. L'UBP est situé dans la région en hélice α et sa conservation est particulièrement flagrante parmi les Hsp70 typiques des Groupes II, VI et VII. Lors de l'inhibition du protéasome, les corps d'inclusion s'accumulent et des protéines ubiquitinilées apparaissent dans des fractions insolubles associées à des chaperons Hsp27, Hsp70 et Hsp90 (Liao et al., 2006) suggérant un rôle dans la dégradation protéique par le protéasome *in vivo* (Gusarova et al., 2001).

Le rôle des Hsp dans le tri protéique est directement lié à leur rôle de chaperonne. Hsp70 est une protéine chaperonne ATP-dépendante dont la capacité de repliement des protéines est modulée par des cochaperones. Le rôle de Hsp70 dans la dégradation protéasomale des protéines semble être plutôt indirect et passer par ses cochaperones CHIP (« C-terminus of Hsc70-Interacting Protein ») et Bag-1 qui coopèrent pour orienter le système chaperonne de la renaturation des protéines vers la protéolyse *via* le protéasome (Demand et al., 2001) (Dai et al., 2005). Suite à leur couplage à l'ubiquitine, les protéines sont dégradées par le protéasome 26S (Arrigo et al., 1988) (Peters, 1994) (Davies, 2001) .

In vivo, il est raisonnable de penser que les Hsp agissent en reconformant les protéines dont la structure a été altérée ou en stimulant les voies de dégradation quand les dommages sont trop importants (Young et al., 2004). En d'autres termes, les Hsp « nettoient » la cellule de toutes les protéines mal conformées ou aberrantes, produites par un stress. (Figure H6).

III.E.3. Hsp70 et voies de l'apoptose

L'apoptose est un processus, régulé au niveau génétique, de suicide cellulaire délibéré retrouvé dans tous les organismes multicellulaires (cf. chapitre II). De multiples situations (stress variés ou stades de développement) induisent une apoptose cellulaire *via* une des deux voies majeures d'activation des caspases effectrices.

Une cellule vivante est un système de multi-gestion dans lequel de nombreuses informations externes et internes (signaux) sont traitées en parallèle et dont les réponses doivent être coordonnées. Les Hsp, par la nature de leurs fonctions, semblent être des coordinateurs des signaux cellulaires et de leurs réponses. L'organisation complexe en réseau des divers compartiments fonctionnels et structuraux d'une cellule implique que les dégâts ou les perturbations défavorables de n'importe quel compartiment peuvent aussi avoir des conséquences variables pour d'autres compartiments. Etant donné l'existence de multiples signaux qui peuvent activer l'une ou l'autre des voies apoptotiques, n'importe lequel de ces compartiments peut déclencher la mort cellulaire selon l'intensité des signaux défavorables reçus.

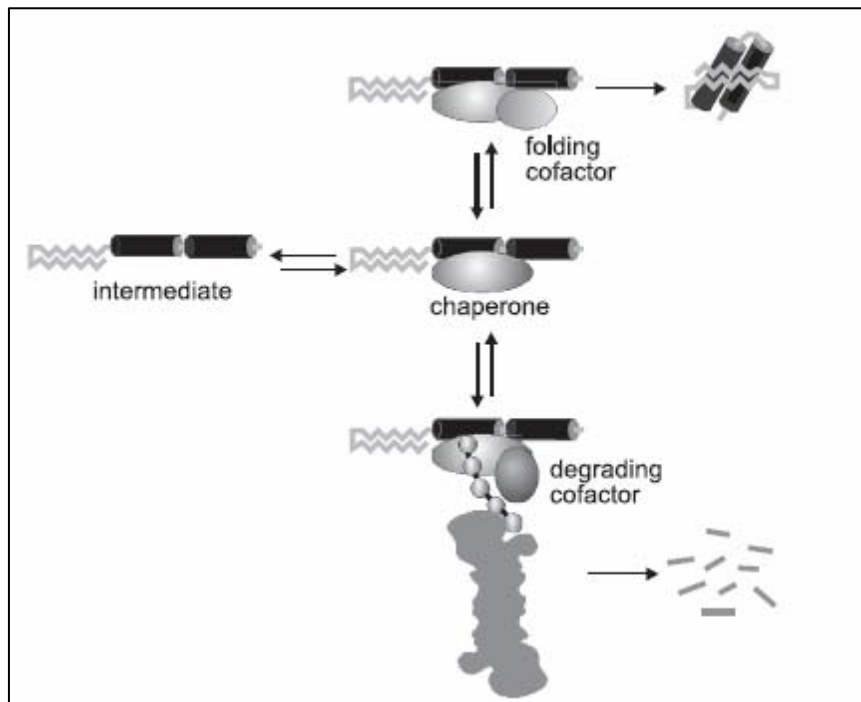


Figure H6 : Modèle du rôle des protéines chaperonnes dans le « folding » et/ou la dégradation protéique

(Tiré de Esser et al, 2004)

Les protéines mal conformées ou altérées sont prises en charge par des protéines chaperonnes qui préviennent la formation d'agrégats protéiques. Ensuite, les molécules chaperonnes s'associent avec divers cofacteurs de « folding » ou de protéolyse, ce qui détermine le destin de la protéine « chaperonnée ».

La mort cellulaire excessive peut être "très coûteuse" pour l'organisme et donc, des points de contrôles appropriés doivent être exercés avant que « l'on » ne permette à la cascade apoptotique d'exécuter la mort cellulaire. Une des propriétés des Hsp est d'être un de ces systèmes de contrôle (Arya et al., 2007). Les Hsp, par leur rôle modulateur des différentes étapes de la cascade apoptotique, peuvent orienter l'équilibre de façon subtile et précise en faveur de la survie cellulaire ou de la mort cellulaire selon le contexte (Csermely, 2004) (Korcsmaros et al., 2007). Les Hsp pourraient également protéger les cellules de certaines voies de nécroses ou d'autres agressions qui ne passent pas par l'apoptose (Kabakov and Gabai, 1995).

Hsp70 et Hsp27 sont anti-apoptotiques, alors que Hsp60 et Hsp10 sont pro-apoptotiques. Hsp70 est une protéine conservée tout le long de l'évolution dont l'expression augmente la capacité de la cellule à survivre à diverses conditions létales. Les rôles des différents membres de la grande famille Hsp70 dans l'apoptose ne sont pas clairement définis, puisque la plupart des études expérimentales sur l'apoptose ont étudié Hsp70 inducible. Les études d'inactivation de gène démontrent que Hsp70 joue un rôle important dans l'apoptose. Les cellules embryonnaires de souris invalidées pour les deux gènes qui codent pour Hsp70 inducible, *hsp70.1* et *hsp70.3*, sont très sensibles à l'apoptose induite par une vaste gamme de stimuli mortels (Schmitt et al., 2003). L'inactivation de l'isoforme d'Hsp70 spécifique de la spermatogenèse (*hsp70.2*) induit une apoptose des cellules germinales (Dix et al., 1996). Hsp70 a une action anti-apoptotique multifocale en interagissant avec les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose à un certain nombre d'étapes (Figure H7)

Voie intrinsèque :

L'augmentation de l'expression d'Hsp70 bloque la voie intrinsèque de la cascade de l'apoptose à différents niveaux, tant en amont qu'en aval de la mitochondrie (Figure H7). Au niveau prémitochondrial, Hsp70 inhibe les voies de signalisation de l'apoptose, que sont les « kinases activées par le stress » JNK et p38 MAPK en interagissant avec ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1). Hsp70 interagit également avec JNK en inhibant sa phosphorylation activatrice par SEK1 (Park et al., 2001). Il a également été proposé, que dans certaines conditions, Hsp70 favoriserait la déphosphorylation de JNK, catalysée par une JNK phosphatase (Meriin et al., 1999).

Au niveau mitochondrial, Hsp70 bloque l'apoptose à plusieurs niveaux. Son effet sur JNK et Mcl-1 (Stankiewicz et al., 2009), en inhibant le transfert et l'insertion de Bax dans la membrane

mitochondriale externe, empêche sa perméabilisation et la libération dans le cytosol de cytochrome c et d'AIF (Stankiewicz et al., 2005). Hsp70 inhibe également Bax en protégeant Mcl-1 de la protéolyse.

Au niveau post-mitochondrial, Hsp70 a été décrite comme inhibant l'apoptose en aval de la libération du cytochrome c et en amont de l'activation de la caspase-3 (Li et al., 2000). Hsp70 inhibe la formation de l'apoptosome et empêche le recrutement de la pro-caspase-9 par interaction directe avec Apaf-1 (Beere et al., 2000) (Saleh et al., 2000).

Il a également été mis en évidence qu'Hsp70 interagirait avec Bag-1, qui en plus de sa fonction co-chaperonne d'Hsp70 régulerait simultanément l'activité de protéines telles que Bcl-2 et Raf-1. Raf-1 et Hsp70 sont en compétition pour interagir avec Bag-1. L'interaction de Bag-1 active Raf-1 et par conséquent ERK, impliqué dans la croissance et la prolifération cellulaire. La surexpression d'Hsp70 diminue le taux d'interaction Bag-1/Raf-1 et ainsi la voie ERK et la croissance cellulaire en réponse au stress (Song et al., 2001) (Gotz et al., 2004).

Voie extrinsèque :

Hsp70 possède également des propriétés inhibitrices de la voie extrinsèque de l'apoptose.

Il a ainsi été décrit qu'Hsp70 protégeait les cellules de la cytotoxicité induite par le TNF (Jaattela et al., 1992). Un des mécanismes possibles passerait par l'inhibition de ASK1 (Park et al., 2002). Il a également été démontré, dans un modèle de leucémie myéloïde chronique humaine, que Hsp70 se lie aux récepteurs de mort TRAIL-R1 et TRAIL-R2, inhibant ainsi la formation de TRAIL et l'activation du DISC (Guo et al., 2005). Le rôle d'Hsp70 dans l'apoptose induite par Fas est plus controversé, avec des effets opposés dépendant du contexte cellulaire.

Hsp70 régule également l'activation de Bid (tBid) par la caspase-8 (Gabai et al., 2002) et peut ainsi influencer les deux voies de la cascade apoptotique (Mosser et al., 2000). Il a été suggéré que Hsp70 pourrait affecter la mort cellulaire Bid-dépendante, en inhibant l'activation de JNK, par un mécanisme qui n'est pas entièrement élucidé (Gabai et al., 2000).

Par ailleurs, l'exposition des cellules hématopoïétiques au TNF- α induit l'activité pro-apoptotique du PKR ((double-stranded RNA)-dependent Protein Kinase). Un inhibiteur de PKR est produit par le gène de FANCC (Fanconi Anemia Complementation group C). Hsp70 interagit avec la protéine FANCC, forme un complexe avec Hsp70-FANCC-PKR et inhibe l'apoptose induite par le TNF- α (Pang et al., 2001) (Pang et al., 2002).

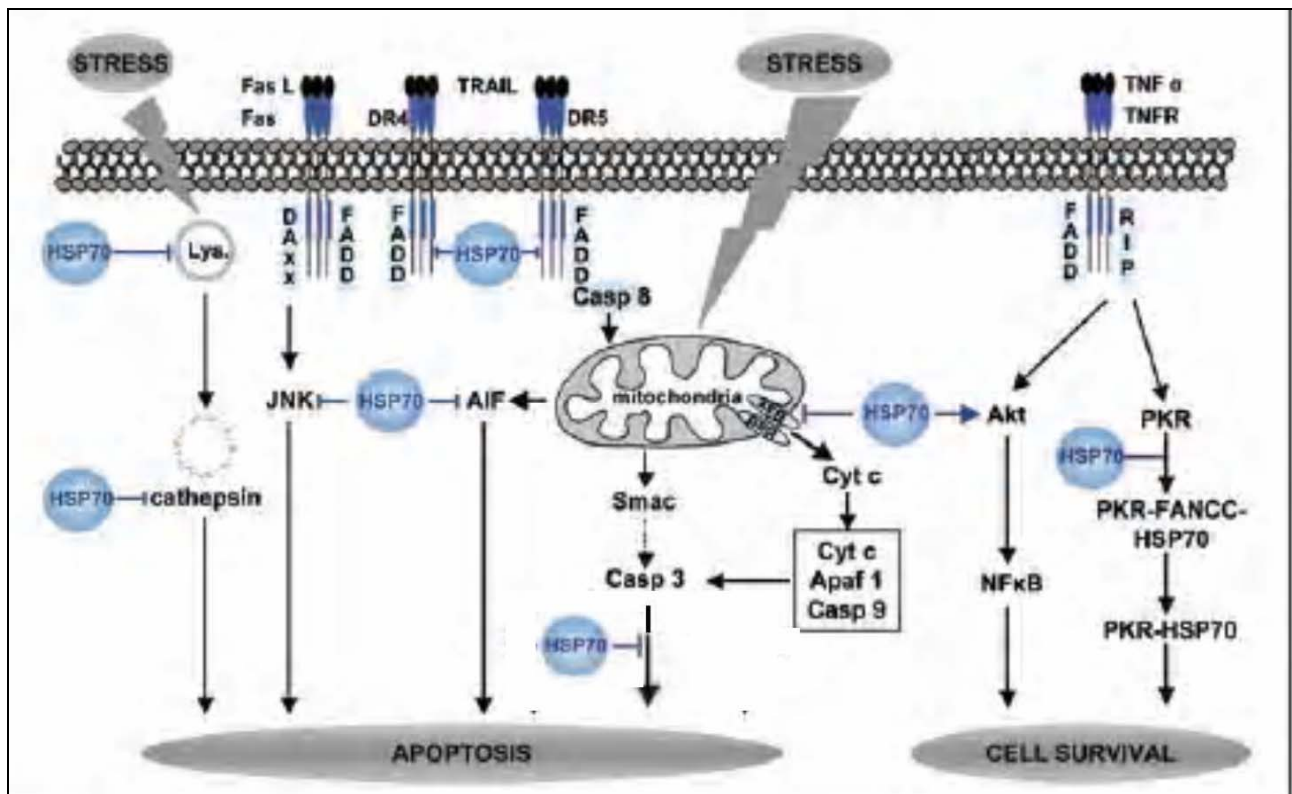


Figure H7: Rôles anti-apoptotique d'Hsp70

(Tiré de Garrido et al, 2006)

Hsp70 a une action anti-apoptotique multifocale en interagissant avec les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose à plusieurs niveaux.

Voie intrinsèque : Au niveau pré-mitochondrial, Hsp70 inhibe les voies de signalisation de l'apoptose, notamment les « kinases activées par le stress » JNK et p38 MAPK. Au niveau mitochondrial, Hsp70, en inhibant le transfert de Bax à la membrane mitochondriale externe, empêche sa perméabilisation et la libération dans le cytosol de cytochrome c et d'AIF. Au niveau post-mitochondrial, Hsp70 inhibe la formation de l'apoptosome et empêche le recrutement de la pro-caspase-9 par interaction directe avec Apaf-1. Hsp70 inhibe également AIF.

Voie extrinsèque : Hsp70 protège les cellules de la cytotoxicité induite par le TNF, inhibe la formation de TRAIL, et régule l'activation de Bid. Hsp70 forme un complexe avec Hsp70-FANCC-PKR et inhibe l'apoptose induite par le TNF-α.

Phase d'exécution de l'apoptose : Hsp70 est la seule molécule anti-apoptotique connue pour agir en aval de la caspase-3 activée.

Il a également été mis en évidence que Hsp70 pourrait se lier et favoriser l'activité de la PKC et d'Akt (Gao and Newton, 2002).

Le rôle d'Hsp70 sur NF-KB est controversé. Le contingent d'Hsp70 cytosolique inhiberait NF-KB alors que le contingent membranaire l'activerait (Lanneau et al., 2008).

Phase d'exécution de l'apoptose :

Il a également été rapporté que Hsp70 interagirait avec la pro-caspase-3 et la pro-caspase-7, ce qui préviendrait leur activation et inhiberait ainsi l'apoptose caspase-dépendante (Komarova et al., 2004). Cependant, ces résultats sur l'effet direct d'Hsp70 sur les pro-caspases-3 et -7 sont controversés (Steel et al., 2004).

Hsp70 a également comme propriété d'inhiber les phases tardives de l'apoptose et elle est la seule molécule anti-apoptotique connue pour agir en aval de la caspase-3 activée. Il a ainsi été mis en évidence dans des cellules de la lignée tumorale WEHI-S que la surexpression d'Hsp70 peut inhiber l'activation par les caspases de cPLA₂ (« cytosolic Phospholipase A2 ») (Jaattela, 1993). Sur le même modèle, il a ensuite été déterminé que l'effet de la surexpression d'Hsp70 contre la toxicité de la staurosporine peut s'exercer en aval de l'activation des caspases en bloquant la fragmentation de l'ADN (Jaattela et al., 1998) (Figure H7). En effet, ces cellules sont capables de reprendre une croissance normale malgré la libération de cytochrome c et le clivage de substrats des caspases comme PARP et PKC δ (Jaattela et al., 1998). Ces résultats indiquent que, dans certaines conditions, le point de non-retour dans la voie de l'apoptose se situe en aval de l'activation des caspases. Dans ce modèle, comme dans les érythroblastes en cours de maturation, la caspase-3 est activée alors qu'il n'y a pas d'apoptose. Il existe actuellement peu de données sur l'expression des protéines Hsp dans des modèles de différenciation hématopoïétique.

Hsp70 est ainsi la seule molécule connue ayant un effet anti-apoptotique en aval de la caspase-3 activée et inhibant ainsi son potentiel pro-apoptotique (Jaattela et al., 1998). Dans ce travail de thèse nous avons émis l'hypothèse que Hsp70 protégerait GATA-1 en aval de la caspase-3 activée, lors de la phase d'activation des caspases, observée au cours de la différenciation érythroïde terminale humaine.

Lors de la phase finale de l'exécution de l'apoptose, l'ADN chromosomique est clivé par la DNase CAD. CAD interagit et est inhibée spécifiquement par ICAD. Au cours de l'apoptose, la

caspase-3 protéolyse ICAD, ce qui libère et active CAD (Garrido et al., 2006a). Pendant la différenciation érythroïde terminale, alors que la caspase-3 est activée, ICAD n'est pas clivé (Zermati et al., 2001). Dans une autre étude sur la lignée cellulaire TF-1 mimant la différenciation érythroïde terminale induite par l'Epo, ICAD est décrite comme étant clivée mais l'expression de CAD diminuerait au niveau transcriptionnel et traductionnel. Cette régulation de CAD expliquerait l'absence de dégradation de l'ADN observée au cours de la différenciation érythroïde terminale. Hsp70 participerait, avec Hsp40, à la bonne conformation de CAD et à la régulation de son activité par ICAD (Sakahira and Nagata, 2002). Il a par ailleurs été rapporté que dans des cellules T de type Jurkat, Hsp70 augmenterait l'apoptose induite après l'activation du TCR/CD3, en interagissant avec CAD, ce qui stabiliserait son activité (Liu et al., 2003). Ce travail sur les Jurkat surexprimant Hsp70 confirme une précédente étude qui avait mis en évidence qu'Hsp70 protégeait ces cellules du choc thermique mais les rendait plus sensibles à l'induction de l'apoptose après l'activation de TCR/CD3 ou Fas/FasL (Liossis et al., 1997). Hsp70 a aussi la propriété de masquer le site d'import de p53 du cytoplasme vers le noyau appelé NLS (« Nuclear Localization Signal »), inhibant ainsi son potentiel d'arrêt du cycle cellulaire (Zylicz et al., 2001).

Apoptose indépendante de l'activation des caspases

Hsp70 peut également inhiber la mort cellulaire dans des conditions où les caspases ne sont pas activées (Creagh et al., 2000) (Ravagnan et al., 2001).

Ainsi, Hsp70 joue un rôle anti-apoptotique sur la voie indépendante des caspases en interagissant avec la flavoprotéine AIF qui est une autre protéine mitochondriale intermembranaire libérée par un stimulus apoptotique. AIF est un partenaire important du processus apoptotique. Hsp70 se lie directement à AIF, empêchant sa translocation nucléaire et ainsi la condensation de la chromatine induite par AIF (Susin et al., 1999) (Ravagnan et al., 2001) (Gurbuxani et al., 2003) (Matsumori et al., 2005; Ruchalski et al., 2006). Cette association est spécifique de Hsp70 : AIF est incapable d'interagir avec d'autres Hsp (Hsp10, Hsp60) et notamment Hsp27 (Bruey et al., 2000). La séquestration d'AIF par Hsp70 diminuerait les lésions cérébrales d'hypoxie/ischémie néonatale (Matsumori et al., 2005). De plus, Hsp70 inhibe l'apoptose au cours de la différenciation érythroïde terminale en bloquant son import nucléaire (Lui JC 2007).

Hsp70 peut aussi s'associer avec l'Endonucléase G, libérée par la MDS à faible risque de transformation leucémique au cours de l'apoptose, et inhiber la fragmentation de l'ADN.

L'interaction entre l'Endonucléase G et Hsp70 ne serait en fait pas directe mais *via* AIF (Kalinowska et al., 2005).

Hsp70 inhibe aussi la mort cellulaire lysosomiale, indépendante de la voie des caspases, en maintenant l'intégrité de la membrane lysosomiale empêchant ainsi la libération des protéases lysosomiales comme la cathepsine dans le cytosol (Nylandsted et al., 2004).

Une étude a également suggéré qu'Hsp70 participerait à la protection de la mort cellulaire par nécrose secondaire, à une déplétion en ATP (Kabakov and Gabai, 1995).

Pour conclure, Hsp70 est un régulateur négatif majeur de la voie mitochondriale de l'apoptose qui peut bloquer la mort cellulaire à plusieurs étapes : au niveau pré-mitochondrial en inhibant la voie de signalisation induite par le stress, au niveau mitochondrial, en empêchant la perméabilisation de la membrane mitochondriale par le blocage de la translocation de Bax, et finalement, au niveau post-mitochondrial en agissant avec AIF et Apaf-1 ou en protégeant les protéines nucléaires essentielles du clivage par la caspase-3 (Figure H7).

L'effet d'Hsp70 sur le processus apoptotique résulte-t-il de l'effet chaperon sur les différentes protéines apoptotiques qui interagissent avec Hsp70? Tous les travaux qui ont étudié les interactions entre les différents éléments impliqués dans l'apoptose et Hsp70 indiquent que c'est par son domaine PBD que Hsp70 se lie à ces protéines. Le rôle du domaine ABD est moins clair. La fonction ATPase de Hsp70 est parfois également nécessaire pour ces propriétés d'interaction/protection. Par exemple, alors que la fonction ATPase semble être nécessaire pour l'interaction avec Apaf-1 (Beere et al., 2000) et AIF (Ruchalski et al., 2006) elle n'est pas obligatoire pour l'interaction avec JNK (Garrido et al., 2006a).

III.F. HSP et érythropoïèse

Il y a une vingtaine d'années, plusieurs études ont noté l'accumulation à des taux importants d'Hsp70 dans les précurseurs érythroïdes (Morimoto and Fodor, 1984) (Banerji et al., 1984) (Singh and Yu, 1984) (Davis et al., 1986) (Banerji et al., 1987) (Winning and Browder, 1988). A l'époque, il avait été envisagé que Hsp70 et d'autres protéines chaperonnes associées qui régulent le folding, la dégradation et les propriétés d'autres protéines pourraient avoir des fonctions spécialisées au cours de la différenciation érythroïde (Banerji et al., 1987).

Hsc70 a été décrit comme étant impliquée dans la régulation de la synthèse de l'hème en interagissant avec la molécule HRI (« Heme Regulated Inhibitor of translation ») qui est une protéine cytosolique se fixant à l'hème et qui réprime la traduction des chaînes de globines dans les précurseurs érythroïdes, en situation de la carence en fer (Chen, 2007). L'interaction d'Hsc70 avec HRI atténuerait son potentiel d'inhibition de la traduction lors des phénomènes d'érythropoïèse de stress (Weiss and dos Santos, 2009).

Hsp70 a été mise en évidence dans les réticulocytes de toutes les espèces testées, mais seulement dans les érythrocytes des espèces ayant des globules rouges nucléés suggérant qu'Hsp70 aurait une fonction liée au noyau de ces cellules (Morimoto and Fodor, 1984). Il a ensuite été décrit que l'expression maximale d'Hsp70 était retrouvée au stade polychromatophile lors de la différenciation érythroïde, pendant l'embryogénèse du poulet (Banerji et al., 1987). Dans un modèle de Zebrafish présentant une mutation ponctuelle de Hspa9b ou mortaline appartenant au groupe mitochondrial de la famille Hsp70, il a été mis en évidence des anomalies du développement incluant une anémie avec une dysérythropoïèse caractérisée par un excès d'apoptose, mimant des aspects pathologiques observés chez l'homme dans les myélodysplasies, entre autres (Craven et al., 2005). L'expression de la mortaline a récemment été décrite au cours de la différenciation érythroïde humaine. Son expression serait induite par l'Epo *via* la voie PI3K/Akt. La mortaline serait impliquée dans la régulation positive de l'expression des gènes induits après stimulation par l'Epo et participerait ainsi à la prolifération des progéniteurs érythroïdes (Ohtsuka et al., 2007).

Chez l'homme, l'expression d'Hsp70 a été observée dans la lignée érythroïde et plus particulièrement dans les érythroblastes matures et non pas dans les érythrocytes (Singh and Yu, 1984). Par ailleurs, l'expression d'Hsp70 a également été décrite dans le modèle de différenciation érythroïde de la lignée K562, après stimulation par l'hémine (Singh and Yu,

1984). Il a ensuite été suggéré, dans ce modèle, que l'expression d'Hsp70 faisait suite à celle d'HSF2- α également induite par l'hémine (Leppa et al., 1997) (cf. supra).

Dans le modèle des cellules TF-1, Hsp70 a également été décrite comme étant exprimée et jouant deux rôles anti-apoptotiques distincts. Au cours de la différenciation érythroïde de cette lignée, Hsp70 interviendrait dans les phénomènes de fragmentation de l'ADN, en régulant l'activité de CAD (cf. supra) et en inhibant le potentiel pro-apoptotique d'AIF en le séquestrant dans le cytosol (Lui and Kong, 2007) (cf. supra).

Ainsi, plusieurs protéines de la famille Hsp70 ont été décrites au cours de l'étude de différents modèles de différenciation érythroïde terminale. Dans ce travail de thèse nous avons étudié l'expression de Hsp70A au cours de la différenciation érythroïde terminale et, comme elle est la seule molécule anti-apoptotique connue pouvant agir en aval de la caspase-3 activée et inhiber son potentiel pro-apoptotique, nous avons posé l'hypothèse qu'elle protégerait GATA-1 en aval de la caspase-3 activée, lors la phase d'activation des caspases observée au cours de la différenciation érythroïde terminale humaine.

BUT DU TRAVAIL

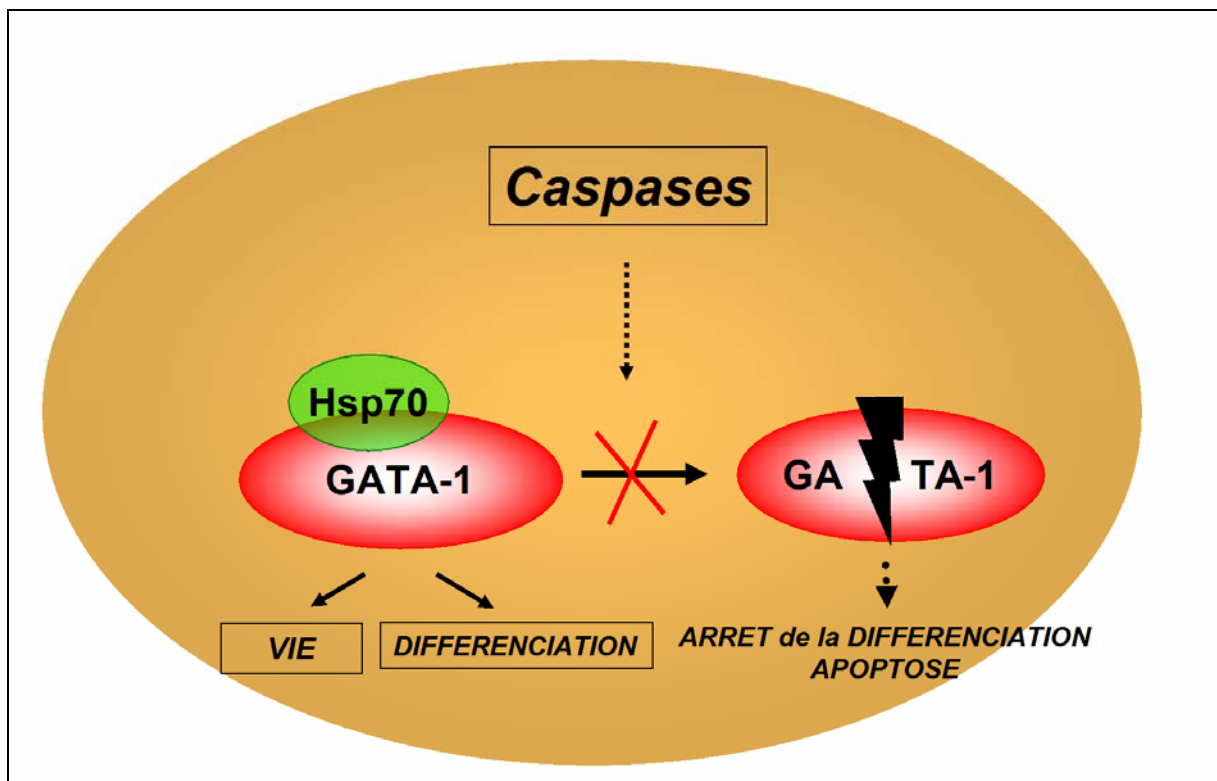


Figure Hypothèse : Hsp70 est impliquée dans les mécanismes de protection des substrats de la protéolyse par les caspases

Au cours de la différenciation érythroïde terminale, lors de la phase d'activation des caspases, GATA-1 n'est pas clivé et régule positivement les gènes érythroïdes....

Notre hypothèse est que Hsp70 pourrait agir en aval de la caspase-3 et ainsi protéger GATA-1 de la protéolyse et les érythroblastes de l'apoptose.

BUT DU TRAVAIL

La caspase-3 a été décrite comme étant activée au cours de deux phases de l'érythropoïèse :

- 1- lors de l'induction des mécanismes de régulation négative de l'érythropoïèse où la caspase-3 protéolyse GATA-1, ce qui a comme conséquence l'arrêt de la maturation et l'apoptose des progéniteurs érythroïdes et des érythroblastes immatures (Maria et al., 1999b).
- 2- au cours de la différenciation érythroïde terminale, durant laquelle cette activation de caspase-3 ne s'accompagne, ni du clivage de GATA-1, ni de l'apoptose des érythroblastes (Zermati et al., 2001).

Ainsi, le destin (apoptose versus différenciation) des précurseurs érythroïdes est décidé en aval de l'activation des caspases en fonction des substrats qu'elles clivent. Il semble donc qu'il existe des mécanismes de protection sélective des substrats des caspases activées lors de l'érythropoïèse. Le but de cette thèse a été de comprendre par quels mécanismes GATA-1 est protégé de la caspase-3 activée lors de la différenciation érythroïde terminale.

La protéine Hsp70 joue un rôle important dans la régulation négative de l'apoptose et elle représente le seul facteur anti-apoptotique décrit comme pouvant agir en aval de l'activation de la caspase-3 et inhiber son action pro-apoptotique (Jaattela et al., 1998). Dans ce modèle décrit par Jaattela en 1998, comme dans les érythroblastes en cours de maturation, la caspase-3 est activée alors qu'il n'y a pas d'apoptose.

Dans ce travail de thèse, nous avons émis l'hypothèse qu'au cours de la différenciation érythroïde terminale, lors de la phase d'activation des caspases, Hsp70 pourrait agir en aval de la caspase-3 et protéger GATA-1 de la protéolyse et les érythroblastes de l'apoptose. Pour cela, nous avons étudié, dans un modèle en culture liquide de différenciation érythroïde terminale humaine, l'expression, la localisation et les interactions de GATA-1, de la caspase-3 activée et des Hsp.

RESULTATS

ARTICLE

Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1.

Ribeil JA, Zermati Y, Vandekerckhove J, Cathelin S, Kersual J, Dussiot M, Coulon S, Cruz Moura I, Zeuner A, Kirkegaard-Sorensen T, Varet B, Solary E, Garrido C, Hermine O.

Nature. 2007,102-5.

Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1

Jean-Antoine Ribeil^{1*}, Yael Zermati^{1,2*}, Julie Vandekerckhove¹, Severine Cathelin², Joelle Kersual¹, Michaël Dussiot¹, Séverine Coulon¹, Ivan Cruz Moura¹, Ann Zeuner³, Thomas Kirkegaard-Sørensen⁴, Bruno Varet^{1,5}, Eric Solary², Carmen Garrido² & Olivier Hermine^{1,5}

Caspase-3 is activated during both terminal differentiation and erythropoietin-starvation-induced apoptosis of human erythroid precursors. The transcription factor GATA-1, which performs an essential function in erythroid differentiation^{1,2} by positively regulating promoters of erythroid and anti-apoptotic genes^{3–6}, is cleaved by caspases in erythroid precursors undergoing cell death upon erythropoietin starvation or engagement of the death receptor Fas^{7,8}. In contrast, by an unknown mechanism, GATA-1 remains uncleaved when these cells undergo terminal differentiation upon stimulation with Epo^{9–11}. Here we show that during differentiation, but not during apoptosis, the chaperone protein Hsp70 protects GATA-1 from caspase-mediated proteolysis. At the onset of caspase activation, Hsp70 co-localizes and interacts with GATA-1 in the nucleus of erythroid precursors undergoing terminal differentiation. In contrast, erythropoietin starvation induces the nuclear export of Hsp70 and the cleavage of GATA-1. In an *in vitro* assay,

Hsp70 protects GATA-1 from caspase-3-mediated proteolysis through its peptide-binding domain. The use of RNA-mediated interference to decrease the Hsp70 content of erythroid precursors cultured in the presence of erythropoietin leads to GATA-1 cleavage, a decrease in haemoglobin content, downregulation of the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-X_L, and cell death by apoptosis. These effects are abrogated by the transduction of a caspase-resistant GATA-1 mutant. Thus, in erythroid precursors undergoing terminal differentiation, Hsp70 prevents active caspase-3 from cleaving GATA-1 and inducing apoptosis.

During erythropoiesis, caspase activation is required for maturation of erythroblasts. In this process, however, in contrast to what occurs during the apoptosis of erythroblasts, some targets, including GATA-1, remain uncleaved (Supplementary Fig. S1). The fate of erythroblasts is therefore determined downstream of caspase activation by an unknown mechanism.

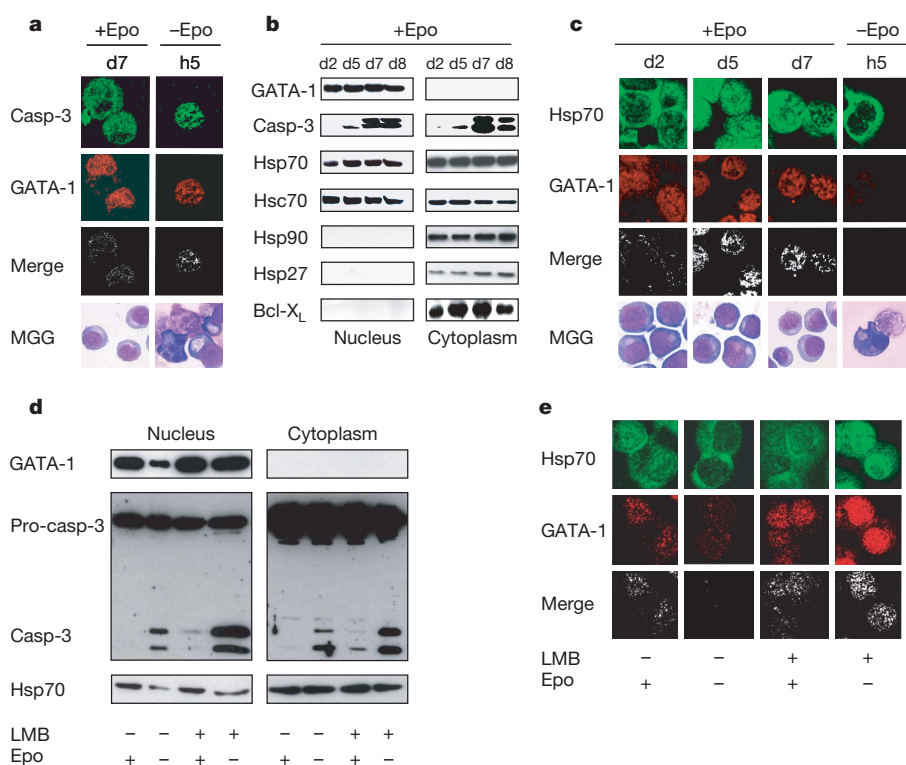


Figure 1 | Hsp70 nuclear expression and co-localization with GATA-1 in differentiating erythroblasts is lost during erythropoietin-starvation-induced apoptosis. **a**, Top three rows: co-localization (white) of GATA-1 (red) and active caspase-3 (p17 subunit, green) at day 7 with erythropoietin (+Epo, d7) or after cytokine starvation for 5 h (–Epo, h5). Bottom row: morphological (MGG) analysis of cytokine-deprived cells (magnification $\times 40$). **b**, Protein expression for the indicated days (d2 to d8) in the presence of erythropoietin. **c**, Top three rows: Hsp70 (green) and GATA-1 (red) co-localize in the nucleus in the presence of erythropoietin. Bottom row: MGG analysis ($n = 5$). **d**, **e**, Immunoblot analysis (**d**) and confocal microscopy analysis (**e**) at day 4, pretreated (+) or not (–) with 20 nM leptomycin B (LMB) for 1 h before being starved of erythropoietin (–Epo) or not (+Epo) for 5 h. One representative experiment of three is shown. Casp, caspase.

¹CNRS UMR 8147, Faculté de Médecine et Université René Descartes Paris V, Institut Fédérative Necker, 75270 Paris, France. ²INSERM UMR 517, 21079 Dijon, France. ³Department of Hematology and Oncology, Istituto Superiore di Santità, 00161 Roma, Italy. ⁴Department of Apoptosis, Institute for Cancer Biology, Danish Cancer Society, Strandboulevarden 49, 2100 Copenhagen. ⁵Department of Hematology, Faculté de Médecine et Université René Descartes Paris V, Assistance publique des hôpitaux de Paris, Necker, 75270 Paris, France.

*These authors contributed equally to this work.

During erythroid differentiation, caspase-3, and to a smaller extent caspase-7 but not other caspases (Supplementary Fig. S2), is found activated in the nucleus and co-localized with GATA-1 (Fig. 1a, b). Bcl-X_L, a key survival factor in erythropoiesis, prevents the release of pro-apoptotic molecules from the mitochondria to the cytosol, upstream of caspase activation^{12,13}; it therefore may not account for the differential effect of activated caspases in erythropoietin-stimulated and erythropoietin-deprived erythroblasts. Other protective proteins include stress-inducible proteins such as the heat-shock proteins Hsp90, Hsp70 and Hsp27. These molecular chaperones modulate the assembly, transport and folding of other proteins¹⁴. They also have key functions in cell survival after stressful stimuli, for example by associating with apoptogenic proteins downstream of the mitochondria, including cytochrome *c* (ref. 15), Apaf-1 (ref. 16) and apoptosis-inducing factor (AIF)¹⁷. The inducible Hsp70 was shown also to rescue cells from apoptosis at a later stage than any other known survival factor, downstream of caspase activation¹⁸. Although its role is unknown, Hsp70 is expressed constitutively in erythroid cells of *Xenopus laevis*¹⁹. On the basis of these observations, we examined whether Hsp70 was expressed during human erythroid differentiation and whether it could protect GATA-1 from cleavage by activated caspases. We studied Hsp70 expression, localization and interaction with GATA-1 during both erythroblast differentiation and erythropoietin-starvation-induced apoptosis.

Hsp27, Hsp70 and Hsp90 proteins were expressed constitutively in human erythroblasts undergoing differentiation (Fig. 1b). Of these three proteins, only Hsp70 was highly expressed in the nucleus of differentiating cells (Fig. 1b), where it co-localized with GATA-1 (Fig. 1c). Similar results were found in fresh bone marrow glycoporphin-A-positive cells (Supplementary Fig. S3), excluding the possibility that the nuclear expression of Hsp70 was the consequence of cell culture. The intensity of GATA-1 and Hsp70 co-localization increased with the level of caspase activation (Fig. 1b, c). In contrast, during erythropoietin-starvation-induced apoptosis, Hsp70 lost nuclear localization, which correlated with a decreased expression of GATA-1 (Fig. 1c–e), indicating caspase-3-mediated cleavage⁸. Addition of the Crm1-mediated nuclear export inhibitor leptomycin B to erythropoietin-starved cells prevented the nuclear export of Hsp70 and degradation of GATA-1, despite a higher level of activated caspase-3 than observed during apoptosis (Fig. 1d, e). Moreover, in the presence of leptomycin B, Hsp70 co-localized with GATA-1 in the nucleus of erythropoietin-starved erythroblasts (Fig. 1d, e).

Immunoprecipitation experiments on whole-cell extracts (Fig. 2a) as well as nuclear extracts (not shown) from differentiated erythroblasts demonstrated that Hsp70 co-immunoprecipitated with GATA-1, whereas neither Hsp90 nor Hsp27 interacted with the transcription factor. This interaction seemed to be specific because Hsp70 did not interact with lamin B, another nuclear protein that is cleaved by caspases in differentiating erythroid cells⁹, or with acinus (data not shown). By using Hsp70 deletion mutants, we observed that binding of Hsp70 to GATA-1 involved the peptide-binding domain of Hsp70 (Fig. 2b, c). After withdrawal of erythropoietin, co-immunoprecipitation between Hsp70 and GATA-1 was decreased as a consequence of GATA-1 cleavage, but the remaining Hsp70 in the nucleus still interfered with and protected GATA-1, as demonstrated by increasing GATA-1 input (Supplementary Fig. S4). Taken together, these data indicate that the peptide-binding domain of Hsp70 was required to maintain GATA-1 integrity when caspases were activated during erythroid differentiation.

Accordingly, an *in vitro* proteolysis assay showed that recombinant Hsp70 protected GATA-1 from cleavage by caspase-3 in a dose-dependent manner, whereas recombinant Hsp90 did not (Fig. 2d). The Hsp70-mediated protection seemed to be protein-specific because, in this *in vitro* assay, Hsp70 did not prevent the caspase-3-induced cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase, a protein cleaved in erythroid cells that are undergoing differentiation (Fig. 2d). In accordance with co-immunoprecipitation experiments, the GATA-1

protection was lost when the peptide-binding domain of Hsp70 was deleted (Fig. 2e).

To further show the role of Hsp70 in determining the fate of erythroblasts, Hsp70 expression was inhibited with an approach involving RNA-mediated interference. Transient transfection of Hsp70-specific short interfering RNAs (siRNA Hsp70) in erythroid precursors significantly decreased the Hsp70 protein level 7.5-fold and 4-fold at days 2 and 4, respectively (Fig. 3a, b); this decrease was observed both in the nucleus and in the cytoplasm (Supplementary Fig. S5). At day 6, Hsp70 level in Hsp70-specific siRNA-transfected cells had returned to the level observed in scramble siRNA-transfected erythroid cells (data not shown). To achieve a greater inhibition of Hsp70 at the time of onset of caspase-3 activation, terminal erythroid differentiation was accelerated by omitting stem cell factor (SCF) from the culture medium²⁰, because this omission did not increase cell apoptosis (data not shown). In these culture conditions, caspase-3 remained inactivated at day 2 and no significant difference was observed between Hsp70-specific and control siRNA-transfected cells with regard to GATA-1 expression, apoptosis and cell differentiation. At the onset of caspase-3 activation (day 4), GATA-1 remained intact in control siRNA-transfected cells, whereas the protein was almost completely degraded in Hsp70-depleted cells (Fig. 3a, b). As

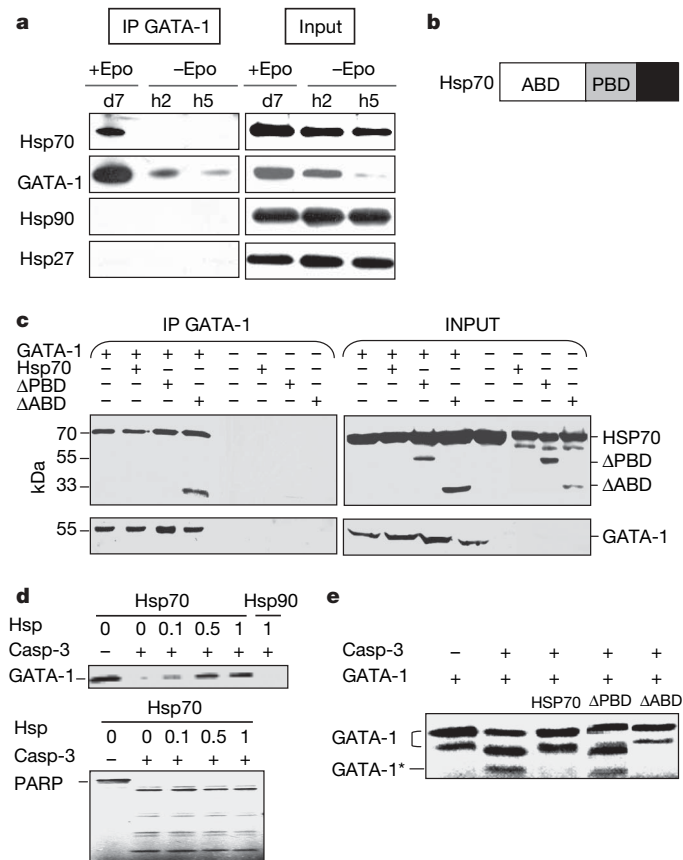


Figure 2 | Co-immunoprecipitation of GATA-1 and Hsp70 during erythroid differentiation. **a**, Immunoprecipitation (IP) of GATA-1 in whole cell extracts at day 7 with erythropoietin (+Epo, d7) or after cytokine starvation for 2 and 5 h (–Epo, h2 and h5), and immunoblotting for indicated proteins. **b**, Representation of Hsp70: ATP-binding domain (ABD) and peptide-binding domain (PBD). **c**, Immunoprecipitation of GATA-1 in GATA-1-transduced HeLa cells transfected with plasmids encoding Hsp70 or mutant (ΔABD, ΔPBD) proteins. **d**, **e**, SDS-PAGE analysis of *in vitro*-translated ³⁵S-labelled GATA-1 and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) exposed to recombinant caspase-3 and increasing amounts (0–1 μg) of recombinant Hsp70 or Hsp90 (1 μg) (**d**) or full-length or deleted mutants of Hsp70 (**e**). GATA-1* indicates a GATA-1 cleaved fragment. In all panels, one representative experiment of three is shown. Casp, caspase.

expected, the degradation of GATA-1 in Hsp70-depleted erythroblasts at day 4 was associated with a strong decrease in the expression of GATA-1-regulated gene products; for example, fewer than 10% of cells were haemoglobinized, in comparison with almost 50% in control cells ($P < 0.005$; data not shown) and Bcl-X_L protein level was decreased (Fig. 3b). Depletion of Hsp70 also markedly decreased the total cell number (Fig. 3d) while increasing the rate of cell death at day 4 (40% in Hsp70-depleted versus 7% in control siRNA-transfected cells; $P = 0.007$; Fig. 3e). Morphological analysis of cells indicated that Hsp70 depletion induced a decrease in cell differentiation (Fig. 3c, f); that is, the proportion of immature erythroblasts (identified by their basophilic cytoplasm and larger size) with nuclear chromatin condensation was only 10% in Hsp70-depleted cells at day 4, which was similar to that in control cells, whereas the proportion of mature erythroblasts (identified by their acidophilic cytoplasm and smaller size) exhibiting nuclear features of apoptosis was about 90% in Hsp70-depleted cells ($P = 0.0004$) (Fig. 3c, g).

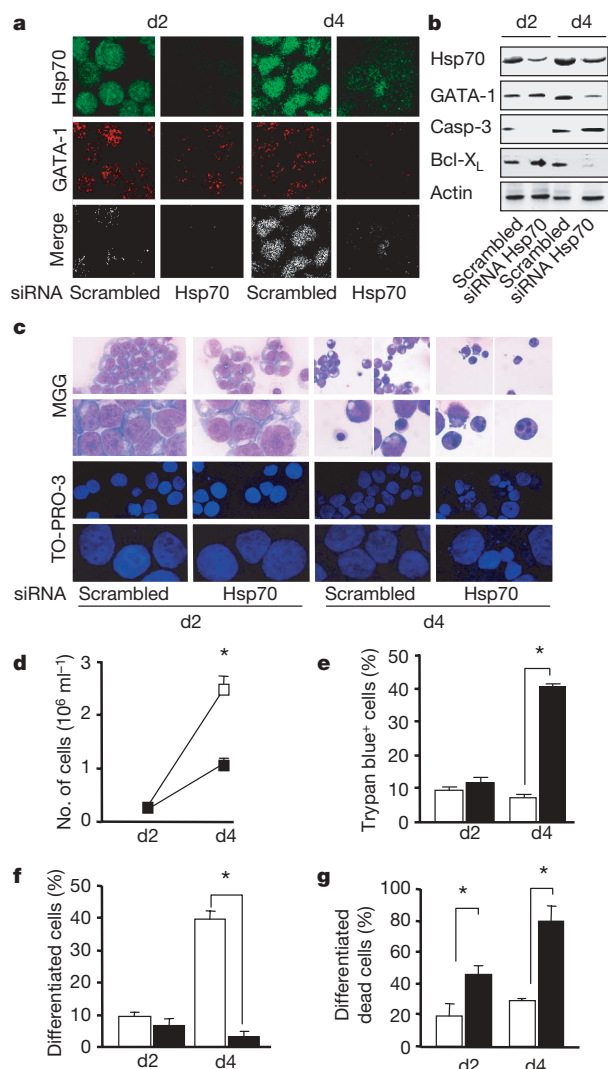


Figure 3 | Decreased Hsp70 content induces death of erythroblasts undergoing differentiation. Analysis of erythroid progenitors 2 days (d2) and 4 days (d4) after transfection with siRNA targeting Hsp70 or a scrambled siRNA. **a**, Confocal microscopy analysis of GATA-1 and Hsp70 expression. **b**, Immunoblot analysis of indicated proteins in whole-cell lysates. **c**, Cell and nucleus morphology assessed by MGG and TO-PRO-3 analysis at various magnifications. **d**, Growth curves. **e**, Percentage of cell death. **f**, Percentage of mature cells. **g**, Percentage of mature cells exhibiting morphological features of apoptosis. Graphed results are means and s.e.m. for three independent experiments; open bars and symbols, scrambled siRNA; filled bars and symbols, Hsp70 siRNA. Asterisk, $P < 0.05$.

Similar results were obtained when Hsp70 expression was decreased by the use of antisense oligonucleotides (Supplementary Fig. S6). We also observed the same results in the presence of SCF, by using a stealth Hsp70 siRNA that exhibits a longer half-life than standard siRNAs, ruling out an increase in apoptosis due to the lack of SCF in the culture medium (Supplementary Fig. S7). Taken together, these findings indicated that Hsp70 depletion prevented erythroid cells from undergoing terminal differentiation by allowing activated caspase-3 to trigger apoptotic cell death.

To check whether the effect of Hsp70-targeting siRNA was due to GATA-1 cleavage rather than to a general effect on cellular metabolism, a previously described GATA-1 mutant (μ G1)⁸ that resists caspase-mediated cleavage was retrovirally transduced in CD34-positive cells. The same vector encoding wild-type GATA-1 (WT G1) and the empty vector were used as controls. Cell proliferation was decreased by 50% both in cells transfected with wild-type G1 and cells in transfected with μ G1, in accordance with previous observations²¹. As expected, transfection with siRNA targeting Hsp70 in cells transduced with either the empty or the wild-type GATA-1-encoding vectors resulted in a decrease in GATA-1 expression (Fig. 4a), cell expansion (Fig. 4b) and cell maturation (Fig. 4d), while increasing

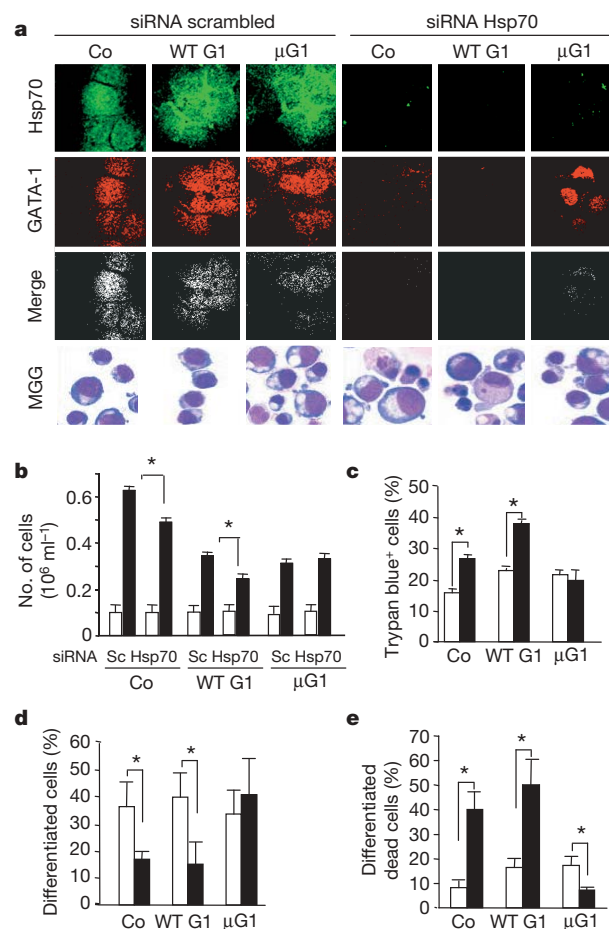


Figure 4 | Transduction of caspase-resistant GATA-1 mutant protects erythroblasts from death after depletion of Hsp70. CD34⁺ haematopoietic cells transduced with an empty vector (Co), a vector encoding wild-type GATA-1 (WT G1), or Asp 125-mutated GATA-1 (μ G1) were transfected with Hsp70 siRNA or scrambled siRNA (Sc). **a**, Confocal microscopy analysis of GATA-1 and Hsp70 expression. Cell maturation was assessed by morphological analysis (MGG) analysis. **b**, Cell expansion assessed at day 2 (open bars) or day 4 (filled bars). **c**, Percentage of trypan-blue-positive cells. **d**, Percentage of differentiated cells. **e**, Percentage of differentiated cells exhibiting morphological features of apoptosis all at day 4. In **c–e**, open bars, scrambled siRNA; filled bars, Hsp70 siRNA. Graphed results are means and s.e.m. for three independent experiments. Asterisk, $P < 0.05$.

mature cell death (Fig. 4c, e). In contrast, Hsp70 siRNA had no significant effect on μ GATA-1 transduced cells (Fig. 4). Taken together, these results suggested that Hsp70 protected differentiating erythroblasts from apoptosis through the inhibition of GATA-1 cleavage by caspase-3.

On the basis of these observations, we propose a model in which erythropoietin protects erythroid cells undergoing differentiation from caspase-mediated apoptosis by regulating the cellular localization of Hsp70 (Supplementary Fig. S8). This model provides a potential explanation for the lack of cell death when caspases are activated in erythroid cells undergoing terminal differentiation^{9–11}. Bcl-X_L is a key protein in erythroid progenitor survival⁴; it acts by preventing the release of pro-apoptotic molecules from the mitochondria^{7,22}. Our results strongly indicate that Hsp70 is another key erythroid antiapoptotic protein that acts both upstream and downstream of Bcl-X_L. First, by protecting GATA-1 from caspase-3-mediated cleavage, Hsp70 maintains Bcl-X_L expression, in synergy with erythropoietin. Second, Hsp70 saves erythroid progenitors in which caspases are activated from apoptosis-inducing GATA-1 proteolysis. We cannot exclude the possibility that, in addition to these two effects, Hsp70 limits caspase-3 activation by interacting with Apaf-1, thus preventing the formation of the apoptosome^{16,23}.

Thus, our data indicate that the fate of erythroblasts—apoptosis versus differentiation—is determined downstream of caspase activation by the nuclear localization of Hsp70.

METHODS

Erythroid cells were generated as described previously²⁴. Details of reagents and protocols for cell proliferation and differentiation analysis, immunoblot analysis, immunoprecipitation, transfection of siRNAs or antisense cDNA targeting Hsp70 in erythroid progenitors, the production of retroviral particles and the infection of haematopoietic progenitors, the generation of Hsp70 mutants, *in vitro* GATA-1 cleavage assays and confocal fluorescence microscopy analysis are provided in Supplementary Methods. Statistical analyses were performed with the Statview software package. Comparisons were made by analysis of variance. Data are expressed as means and s.e.m. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Received 16 June; accepted 25 October 2006.

Published online 10 December 2006.

1. Fujiwara, Y. *et al.* Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 12355–12358 (1996).
2. Pevny, L. *et al.* Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* **349**, 257–260 (1991).
3. Weiss, M. J., Keller, G. & Orkin, S. H. Novel insights into erythroid development revealed through *in vitro* differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev.* **8**, 1184–1197 (1994).
4. Motoyama, N. *et al.* *bcl-x* prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *J. Exp. Med.* **189**, 1691–1698 (1999).
5. Weiss, M. J. & Orkin, S. H. Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 9623–9627 (1995).

6. Gregory, T. *et al.* GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating *bcl-x_L* expression. *Blood* **94**, 87–96 (1999).
7. Gregoli, P. A. & Bondurant, M. C. Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythroid progenitors. *J. Cell. Physiol.* **178**, 133–143 (1999).
8. De Maria, R. *et al.* Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* **401**, 489–493 (1999).
9. Zermati, Y. *et al.* Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J. Exp. Med.* **193**, 247–254 (2001).
10. Carlile, G. W., Smith, D. H. & Wiedmann, M. Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood* **103**, 4310–4316 (2004).
11. Kolbus, A. *et al.* Raf-1 antagonizes erythroid differentiation by restraining caspase activation. *J. Exp. Med.* **196**, 1347–1353 (2002).
12. Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483–487 (1999).
13. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322–1326 (1998).
14. Garrido, C. *et al.* HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle* **2**, 579–584 (2003).
15. Bruey, J. M. *et al.* Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nature Cell Biol.* **2**, 645–652 (2000).
16. Beere, H. M. *et al.* Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biol.* **2**, 469–475 (2000).
17. Ravagnan, L. *et al.* Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nature Cell Biol.* **3**, 839–843 (2001).
18. Jaattela, M. *et al.* Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J.* **17**, 6124–6134 (1998).
19. Winning, R. S. & Browder, L. W. Changes in heat shock protein synthesis and hsp70 gene transcription during erythropoiesis of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **128**, 111–120 (1988).
20. Muta, K. *et al.* Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. *Blood* **86**, 572–580 (1995).
21. Munugalavada, V. *et al.* Repression of c-kit and its downstream substrates by GATA-1 inhibits cell proliferation during erythroid maturation. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 6747–6759 (2005).
22. Gregoli, P. A. & Bondurant, M. C. The roles of Bcl-X_L and apopain in the control of erythropoiesis by erythropoietin. *Blood* **90**, 630–640 (1997).
23. Saleh, A. *et al.* Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature Cell Biol.* **2**, 476–483 (2000).
24. Zermati, Y. *et al.* Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. *Exp. Hematol.* **28**, 885–894 (2000).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements We thank C. Pouzet for her assistance in confocal analysis, F. Valensi and V. Asnafi for their assistance in cytological analysis, Y. Dumez, A. Benachi and F. Audat for providing us with cord blood samples; U. Testa for the cDNAs of GATA-1 and poly(ADP-ribose) polymerase subcloned in PET21; and A. Benmerah for providing us with leptomycin B. This work was supported by grants from the Ligue nationale contre le cancer (LNC), the Fondation pour la recherche médicale (FRM), the Association pour la recherche sur le cancer (ARC), Cancéropole d'Île de France, Fondation de France, Ministère de la recherche and AMGEN.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare no competing financial interests. Correspondence and requests for materials should be addressed to O.H. (hermine@necker.fr) or Y.Z. (zermati@igr.fr).

Supplementary note

Hsp70 and Hsc70

In humans, the inducible Hsp70 and the cognate Hsc70 proteins belong to a same family of proteins, and are encoded by distinct genes with some homologies (e.g. human *Hsc70* demonstrated up to 80% homologies with human *Hsp7A1*). In many cell types, Hsc70 is constitutively expressed and insensitive to stress, whereas Hsp70 is highly sensitive to stress. In *Xenopus Laevis* erythropoiesis, *hsp70* gene is constitutively transcribed at earlier stages of differentiation and heat shock-dependent at later stages (orthochromatic erythroblasts) (RS Winning and LW Browder, 128 (1):111-120, 1988 Dev Biol). To date, the expression and the role of Hsp70 are unknown in human erythropoiesis.

Supplementary methods

Reagents

Antibodies used included those targeting GATA-1 (N1 and C20 for immunoblot; N6 for confocal immunofluorescence microscopy and immunoprecipitation), Lamin B (M20), Hsp27 (M20) and Actin (I19) from Santa Cruz, Bcl-X_L (610211) from BD Biosciences, GPA (555569) from BD Pharmingen, Hsp70 (SPA-812), Hsp90 (SPA-830) and Hsc70 (SPA-815) from Stressgen Laboratories, activated caspase-3 from Cell signaling (#9661) for confocal microscopy and from Neomarkers (RB-1197) for immunoblotting. TO-PRO-3 (T-3605) and Orange Sytox (S11368) were from Molecular Probes, anti-rat-cy3 (712-166-153) and rabbit-cy5 (111-175-144) from Jackson ImmunoResearch, and rat immunoglobulin G (R 5005) from Sigma. Leptomycin B was a gift from Dr. A Benmerah, (Cochin Institute, Paris).

In vitro generation of erythroid cells.

Umbilical cord blood units from normal full-term deliveries were obtained, after informed mothers' consent, from the Obstetrics Unit of Hôpital Necker-Enfants Malades. CD36⁺ erythroid progenitors, generated from 7 days IL-6 (100 ng/ml) +IL-3 (10 ng/ml) +SCF (100 ng/ml)-cultured CD34⁺ progenitors isolated from cord blood (Miltenyi CD34 Progenitor Cell Isolation Kit), were cultured in the presence of IL-3 (10 ng/ml) + SCF (100 ng/ml) + Epo (2U /ml) in IMDM (Gibco cell culture) supplemented with 15% BIT 9500 (Stem Cell

Technologies) as described earlier [1]. After seven days of culture, apoptosis was induced by cytokines starvation (-Epo) during two (h2) or five (h5) hours.

Immunoblot analyses.

Cells were lysed in Laemmli buffer (whole cell lysates) or lysed 5 min on ice in a lysis buffer (0.2% NP40, 20mM Hepes pH7.9, 10mM KCl, 1mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM orthovanadate, 1mM PMSF, 1 mM DTT, and 10µg/ml of aprotinin/leupeptin/pepstatin) before centrifugation (2 min, 14,000 rpm) and supernatant collection (cytoplasmic extracts). Remaining pellets were lysed (350mM NaCl; 20% glycerol; 20mM Hepes pH 7.9; 10mM KCl; 1mM EDTA; 1mM orthovanadate, 1mM PMSF, 1mM DTT, and 10µg/ml of aprotinin/leupeptin/pepstatin), incubated for 30 min on ice and centrifuged for 20 min at 14,000 rpm before collecting the supernatant (nuclear extracts).

Whole lysates of 5×10^5 cells or 50µg of proteins of nuclear or cytoplasmic extracts were resolved on 12% acrylamide gels and analysed by immunoblotting. Antigens were visualized by chemiluminescence using SuperSignal West Dura (Pierce).

Generation of Hsp70 mutants

Recombinant Hsp70 was generated using the pET-16b vector system (Novagen) with induction of protein expression and subsequent Ni^{2+} -affinity-purification according to the manufacturer's protocol. Mutants of Hsp70 lacking either the ATP (Δ ABD) or the peptide binding (Δ PBD) domain were generated through restriction enzyme cleavage and subsequent ligation of full-length Hsp70 cDNA in pET-16b vector. Δ ABD was generated through *Bgl*II digestion, creating an in-frame deletion of amino acids 119-426 comprising the ATPase domain. Δ PBD was generated through *Sma*I digestion, creating an in-frame deletion of amino acids 437-617 comprising the peptide-binding domain. After purification, all proteins had their His-tag removed and were subsequently buffer-exchanged to D-PBS.

Cell fractionation and immunoprecipitation

Protein-protein interactions between GATA-1 and Hsp70 were determined by immunoprecipitation (IP) experiments. Cell fractionation was performed by incubating the cells in ice-cold buffer [250mM sucrose, 20mM HEPES, 10mM KCl, 1.5mM MgCl_2 , 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM orthovanadate, 1mM PMSF, 1mM DTT, and 10µg/ml of aprotinin, leupeptin, pepstatin (pH 7.4)], then by homogenization in a Potter-Thomas

homogenizer. Nuclei were pelleted via a 10 min, 3,200 rpm spin and the supernatant (cytoplasm) was collected [2]. Nuclei and whole cells (obtained from 10^7 cells) were lysed on ice in an IP buffer (1% NP40, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 65mM Tris Hcl pH 8, 50mM Hepes, 3% glycerol, 1mM orthovanadate, 1mM PMSF, 1mM DTT, and 10 μ g/ml of aprotinin, leupeptin, pepstatin) for 20 min, then spun at 14,000 rpm for 30 min and the supernatant was collected. Nuclei or whole cell lysates were incubated on ice for 1.5 hours with either an anti-GATA-1 (2 μ g) or and anti-Hsp70 (1/100) antibody in the presence of 50 μ l Protein G Microbeads (Miltenyi). The immune complex was immobilized to a μ Column, isolated according to the manufacturer's instructions and analyzed by immunoblotting.

In vitro GATA-1 cleavage assays

GATA-1 and PARP cDNAs subcloned in PET21 plasmid in frame with amino-terminal T7 tag (GATA-1-PET, PARP-PET) (kindly provided by Dr De Maria and A Zeuner, Roma, Italy) were transcribed by using the In Vitro Translation Kit (L4610) from Promega in the presence of [35 S]-methionine (Amersham Biosciences). Two μ l of GATA-1 or PARP translation reaction were preincubated with either human recombinant Hsp70 (NSP-555) (0 to 1 μ g) or Hsp90 (SPP-770) (1 μ g) from Stressgen Laboratories and Hsp70 mutants (Δ ABD or peptide Δ PBD) in a stoichiometric manner (\sim 1 μ g HSP70) for 40 minutes at room temperature in buffer (25mM Hepes, 0.1% Chaps, 5mM DTT, 1mM EDTA, PH7.5) in a final volume of 15 μ l, then incubated for 1h at 37°C with 70ng recombinant caspase-3 in a final buffer volume of 25 μ l. Reaction products were run on 10% acrylamide gel, and GATA-1 and PARP products were analyzed by autoradiography of dried gel.

Hsp70 siRNAs.

All siRNAs were obtained from Qiagen, and included a non-silencing Alexa Fluor 488 labeled siRNA, a specific siRNA for inducible Hsp70 (CTG GCC TTT CCA GGT GAT CAA); a scramble siRNA (CAG TAA TTG CAC CCG TCG TGT). Stealth siRNA for Hsp70 (ACU UCG UGG AGG AGU UCA AGA GAA A) and a control stealth siRNA (Block-iT, manufacturer's confidential sequence) were obtained from Invitrogen, life technologies.

Transfection of HeLa cells.

HeLa cells were infected with viral particles containing GFP-tagged GATA-1 vector [3] and GFP-positive cells were selected by cell sorting using a Coulter EPICS EPS (Beckman

Coulter). Twenty-four hours after seeding, these cells were transfected with either wild type or mutated Hsp70 constructs (subcloned in pcDNA3 vector) using the Superfect transfection reagent (Qiagen, Valencia, CA) following the manufacturer's instructions, and analyzed 48 hours later.

Transfection of hematopoietic progenitors.

2.10^6 of five days IL-6 (100 ng/ml) +IL-3 (10 ng/ml) +SCF (100 ng/ml)-cultured CD34⁺ cells were transfected in a Human CD34 Cell Nucleofector buffer with 10 μ g of siRNA using a Nucleofector (Amaxa Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Cells were then cultured for 1 day with IL-6+IL-3+SCF. Thereafter, dead cells were removed with Dead Cell Removal Kit (Miltenyi). Transfection efficiency of the non-silencing Alexa Fluor 488 labeled siRNA was examined by FACS analysis (>90% of viable cells) (data not shown). Remaining alive cells were cultured with Epo+IL-3 in serum-free medium.

Production of retroviral particles and infection of haematopoietic progenitors.

Wild-type (WT) and mutated GATA-1 (μ GATA-1) cloned in PINCO vector [3] were transfected in the amphotrophic packaging cell-line PLAT-A (kindly provided by Pr Toshio Kitamura, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan) and supernatants containing viral particles were collected 48 h after transfection. CD34⁺ cells exposed to SCF (100 ng/ml), IL-3 (60 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml) and TPO (100 ng/ml) were daily infected during 72h, after 24h of culture. After three additional days of culture without TPO, siRNA were transfected 24h later after last infection. Finally, cells were grown in serum-free medium supplemented with IL-3 (0.01 U/ml) and Epo (3 U/ml). GFP-positive cells were sorted 24 h after siRNA transfection using a FACS VANTAGE cell sorter (Becton Dickinson).

Cell permeabilization and labelling for Fluorescence microscopy

5.10^4 cells were washed, spin on slides, acetone fixated, hydrated with cold 1X PBS/1% BSA for 30 minutes, treated with formaldehyde (Sigma) for 15 minutes, then with methanol (Prolabo) for 10 minutes at room temperature. Cells were then permeabilized with 1X PBS/0.2% Triton X100 (Sigma) for 10 minutes at 4°C, washed with 1X PBS/1% BSA and incubated in 3% BSA for 30 min. They were then sequentially incubated with antibodies diluted in 1XPBS/1% BSA/0.1% Tween (Sigma): anti-GATA-1 overnight at 4°C; then anti-rat-Cy3 for 45 minutes at room temperature, then rabbit anti-Hsp70 or anti-caspase-3 for 1 hour at room temperature, then anti-rabbit Cy5 for 45 minutes at room temperature. Nuclei

were stained with TO-PRO-3, and slides were examined with a confocal laser microscope (LSM 510 Carl Zeiss).

Fresh normal bone marrow cells were separated by centrifugation on Ficoll, spin on slides and fixed with acetone. Permeabilization and labelling with anti-GATA-1 and anti-Hsp70 antibodies was performed as above. Then, the cells were incubated for 1 hour at room temperature with anti-GPA antibody and DNA was stained with Orange Sytox for 5 min at room temperature before confocal laser microscope observation.

Supplementary figure legends

Figure 1S. Role of caspases in erythropoiesis regulation. A- Caspase-3 is required for terminal erythroid maturation. Erythropoiesis is a multistep process that involves the sequential formation of proerythroblasts (ProE) and basophilic (Baso), polychromatic (Poly) and orthochromatic (Ortho) erythroblasts leading to red cells (RC) production. During maturation of erythroblasts, caspase-3 is activated and its inhibition results in erythroid differentiation arrest at the proerythroblast stage. **B-** Patterns of caspase-3-induced proteolysis during apoptosis and differentiation of erythroid cells. During both apoptosis and differentiation, caspase-3 cleaves several targets involved in nucleus and chromatin condensation. In contrast, GATA-1 is protected from caspase-3 proteolysis during erythroid differentiation. GPA (glycophorin A), Hb (hemoglobin), Epo (erythropoietin).

Figure 2S. Caspase 3 is the main caspase activated in the nucleus of erythroblast during erythroid differentiation.

Immunoblot analysis of caspases 3, 6, 7, 8, 9 activation in nucleus and cytoplasm extracts of CD36⁺ cells cultured for 7 days in the presence of Epo+IL-3+SCF and then Epo-starved (-Epo) or not (+Epo) for 5 hours. Cleavage fragments of caspase-3, suggesting activation, and the proform of caspase-7 (without cleavage fragments) were detected in the nucleus. Caspase 6, or caspase 8 were not identified in the nucleus.

Figure 3S. Nuclear colocalization of Hsp70 and GATA-1 in GPA positive cells from fresh normal human bone-marrow.

Expression analysis by confocal microscopy in normal fresh bone-marrow cells of **a-** GPA (blue), GATA-1 (red) and Hsp70 (green). White hue shows GATA-1 and Hsp70

colocalization. **b-** GPA (blue), Hsp70 (green), DNA (yellow). **c-** Morphologic analysis after May Grunwald staining (MGG).

Figure 4S. Ability of Hsp70 interaction with GATA-1 is not affected by Epo starvation.

CD36⁺ cells cultured for 7 days in the presence of Epo+IL-3+SCF and then Epo-starved (-Epo) or not (+Epo) for 5 hours. Nuclear proteins were immunoprecipitated using an anti-GATA-1 antibody, then immunoblotted for indicated proteins. A 5-fold increase in the input of nuclear extract from cells starved of Epo (h5x5) is compared to non starved cells (d7).

Figure 5S. Before caspase activation, decrease in nuclear Hsp70 content is not associated with GATA-1 degradation.

After 5 days of culture in the presence of IL-3+IL-6+SCF, CD34⁺ progenitors were transfected with 10 µg of a siRNA targeting Hsp70 (siRNA Hsp70) or a scrambled siRNA (siRNA control). Two days after transfection, cells were diluted to 4.10⁵ cells/ml, and then cultured in the presence Epo+IL-3 for 2 days. Immunoblot analysis of indicated proteins in nuclear and cytoplasmic extracts is shown (see also figure 3b, day 2).

Figure 6S. Decreased Hsp70 content induces death of erythroblasts undergoing differentiation.

After 5 days of culture in the presence of IL-3+IL-6+SCF, CD34⁺ progenitors were transfected with 10 µg of an antisense targeting Hsp70 or a control antisense. Two days after transfection, cells were diluted to 4.10⁵ cells/ml, then cultured in the presence Epo+IL-3 for indicated times (days). **a-** Growth curves. **b-** Percentage of cell death. **c-**Percentage of mature cells. **d-** Percentage of mature cells exhibiting morphological features of apoptosis. Results are the mean +/- SD of 3 independent experiments. * p < 0.05. **e-** Immunoblot analysis of Hsp70 in whole cell lysate at day 2 of culture (d2). The non-inducible Hsc70 is used as loading control.

Figure 7S. Decreased Hsp70 content induces death of erythroblasts undergoing differentiation even in the presence of SCF.

After 5 days of culture in the presence of IL-3+IL-6+SCF, CD34⁺ progenitors were transfected with 10 µg of an siRNA stealth targeting Hsp70 or a control siRNA stealth. Two days after transfection, cells were diluted to 4.10⁵ cells/ml, then cultured in the presence Epo+IL-3 and in the presence of SCF for indicated times (days). **a-** Growth curves. **b-**

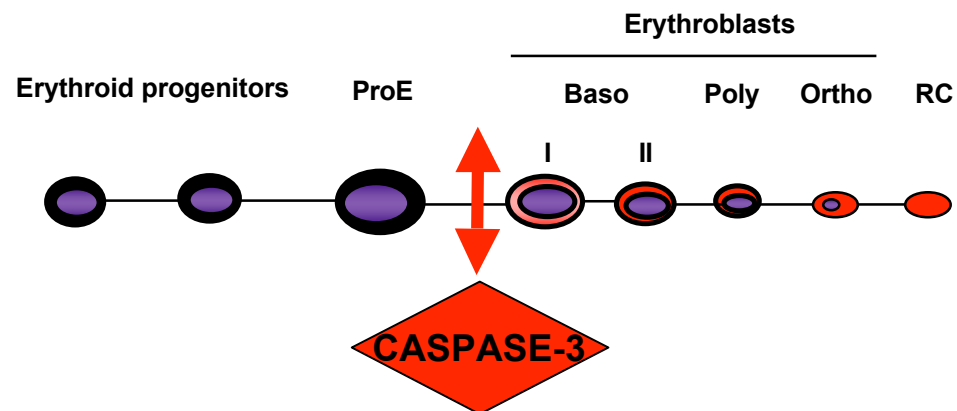
Percentage of cell death. **c-** Percentage of mature cells. **d-** Percentage of mature cells exhibiting morphological features of apoptosis. Results are the mean \pm SD of 3 independent experiments. * $p < 0.05$. **e-** Immunoblot analysis of Hsp70 in whole cell lysate at day 2 of culture (d2). The non-inducible Hsc70 is used as loading control.

Figure 8S. Model of GATA-1 protection from caspase-3-induced cleavage by Hsp70 during erythroid differentiation.

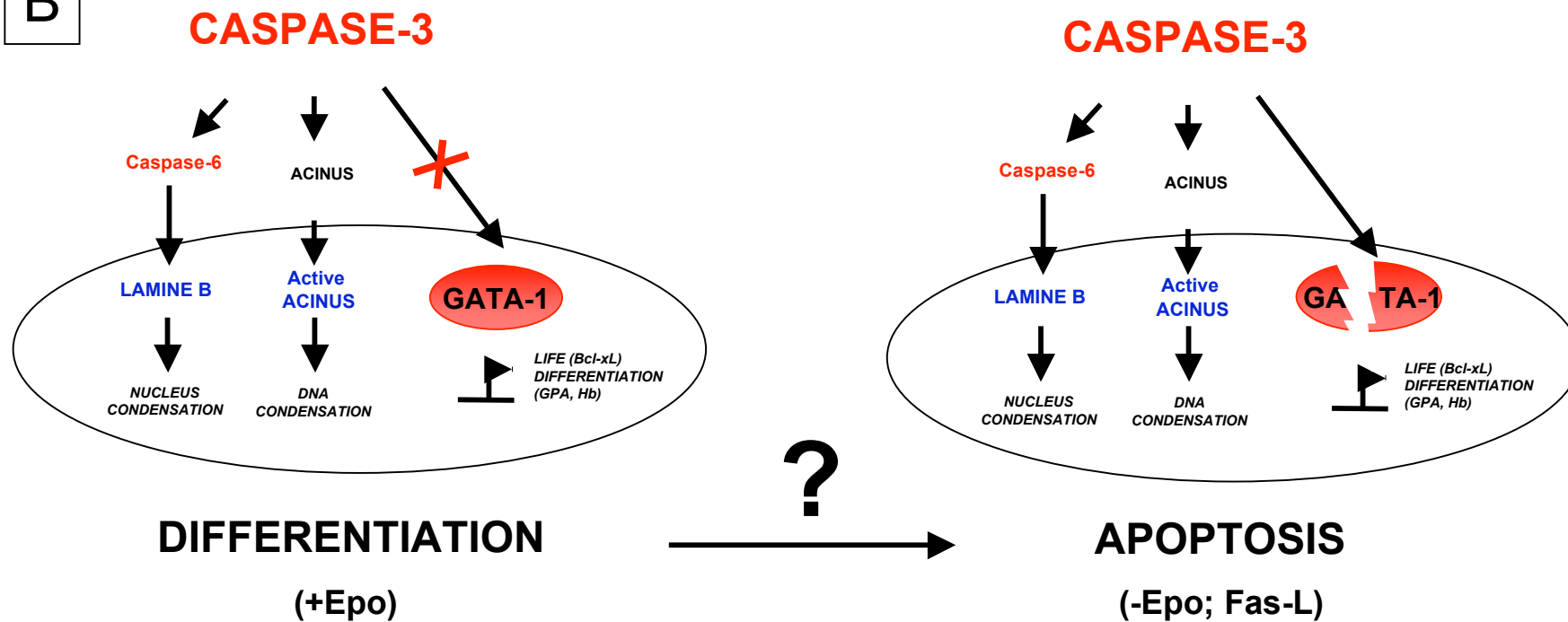
Supplementary references

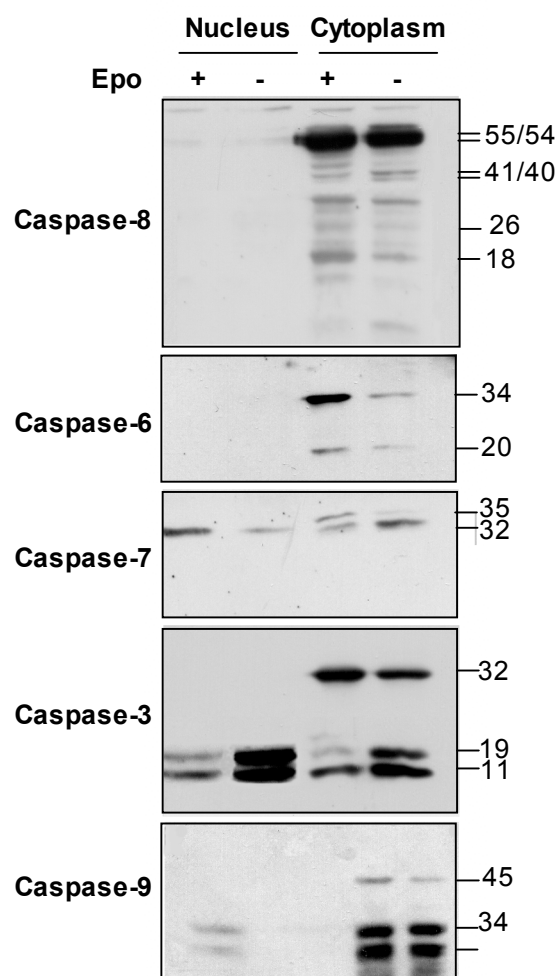
1. Zermati, Y., et al., *Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors*. Exp Hematol, 2000. **28**(8): p. 885-94.
2. Gurbuxani, S., et al., *Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells*. Oncogene, 2001. **20**(51): p. 7478-85
3. De Maria, R., et al., *Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1*. Nature, 1999. **401**(6752): p. 489-93

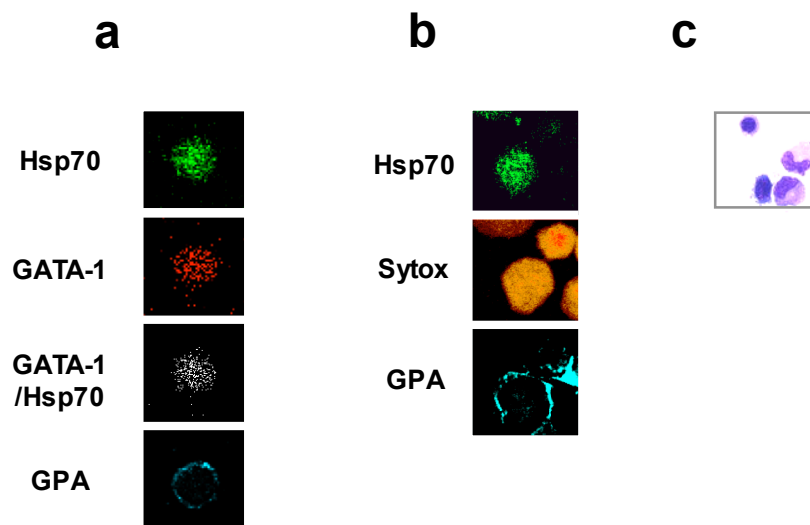
A

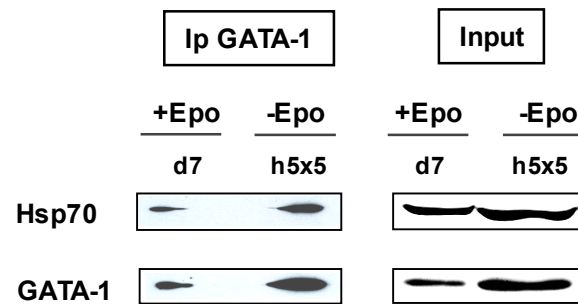


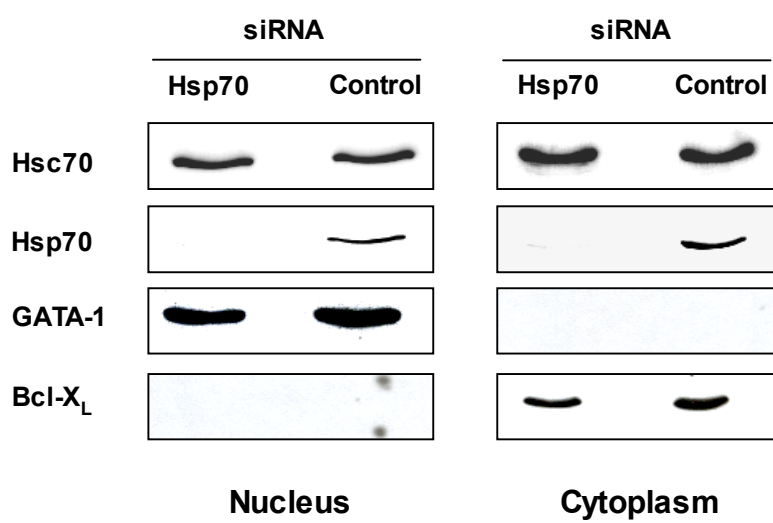
B

Fig.1S₈

**Fig.2S**

**Fig.3S**

**Fig.4S**

**Fig.5S**

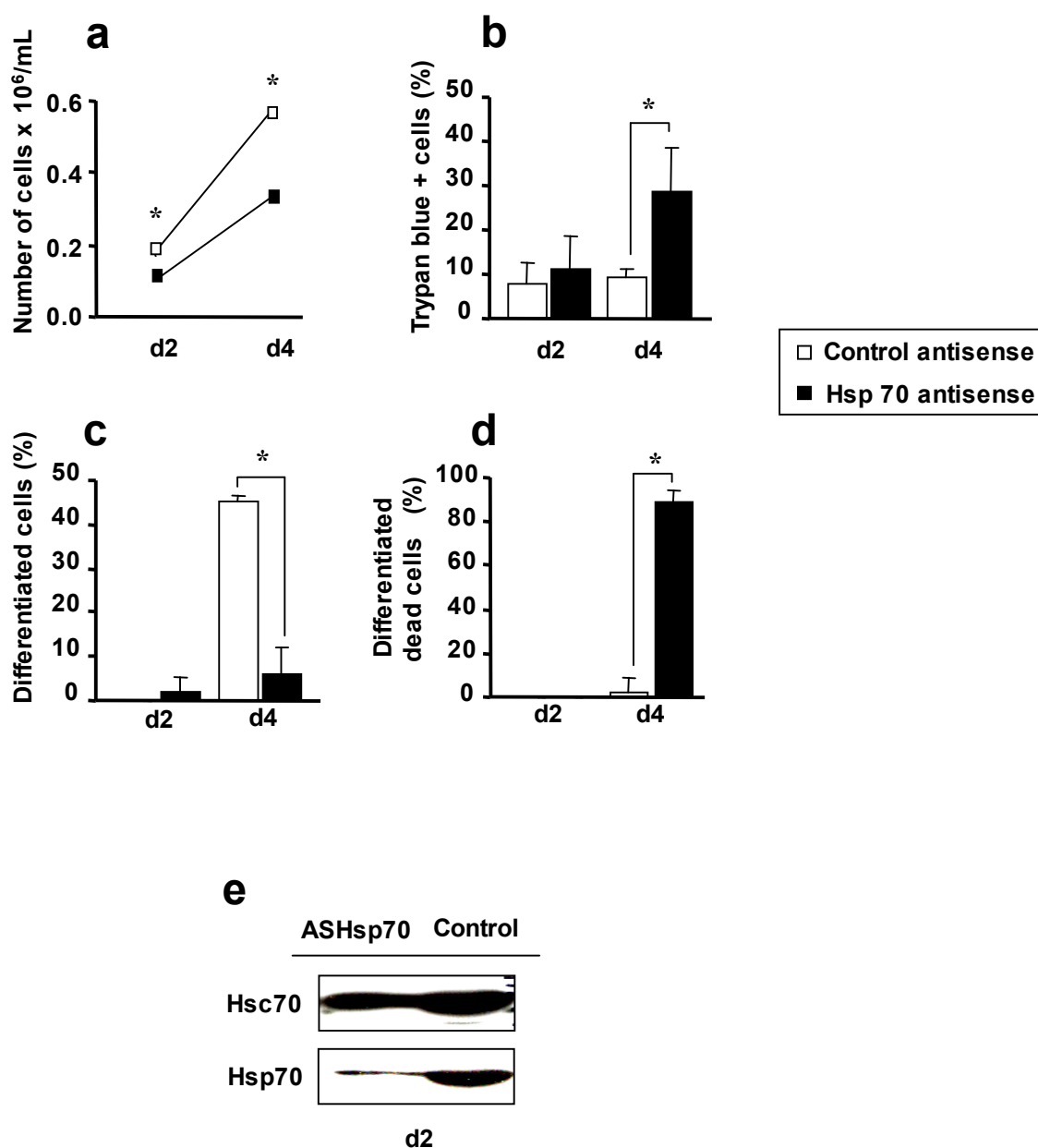


Fig.6S

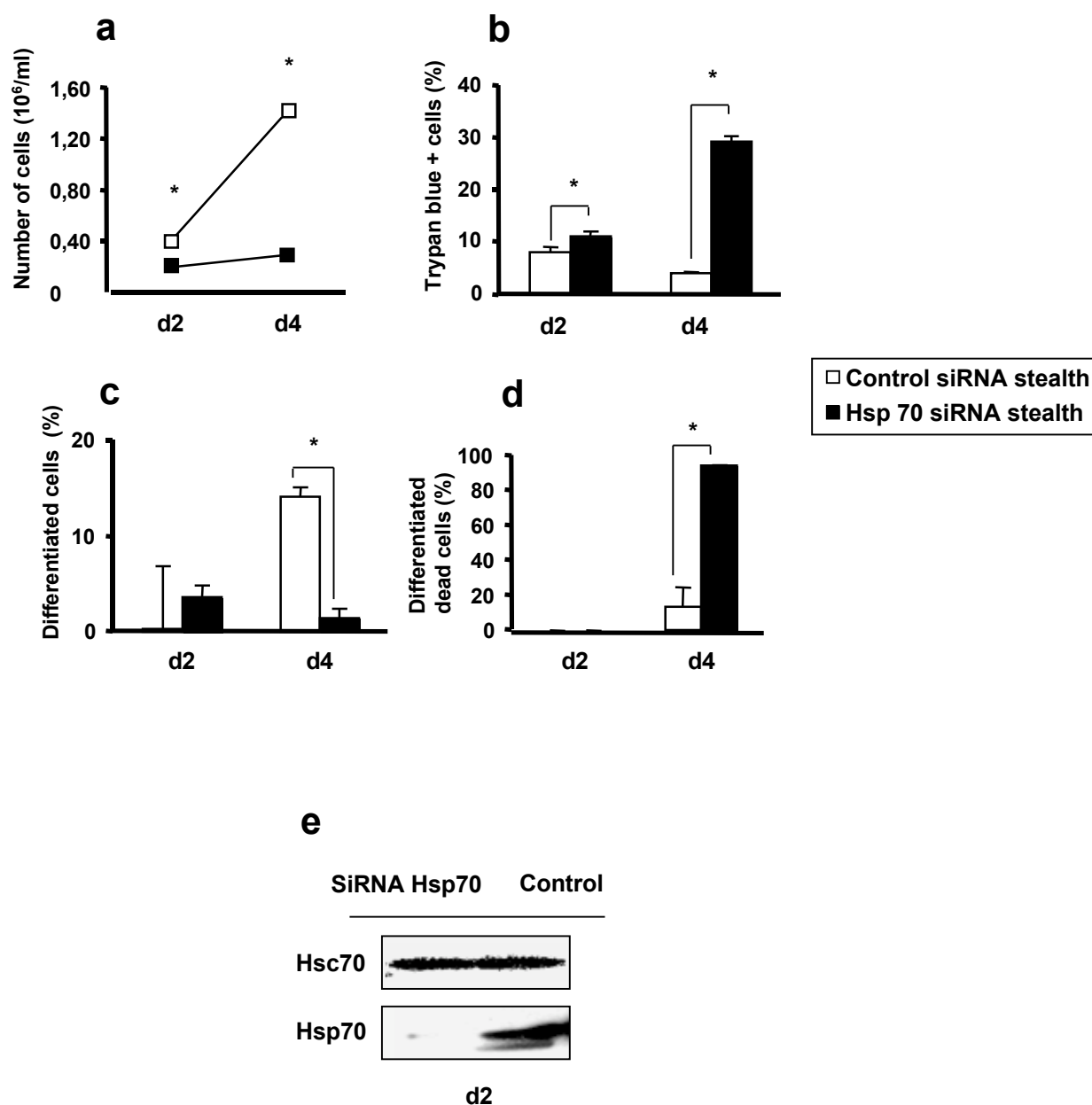


Fig.7S

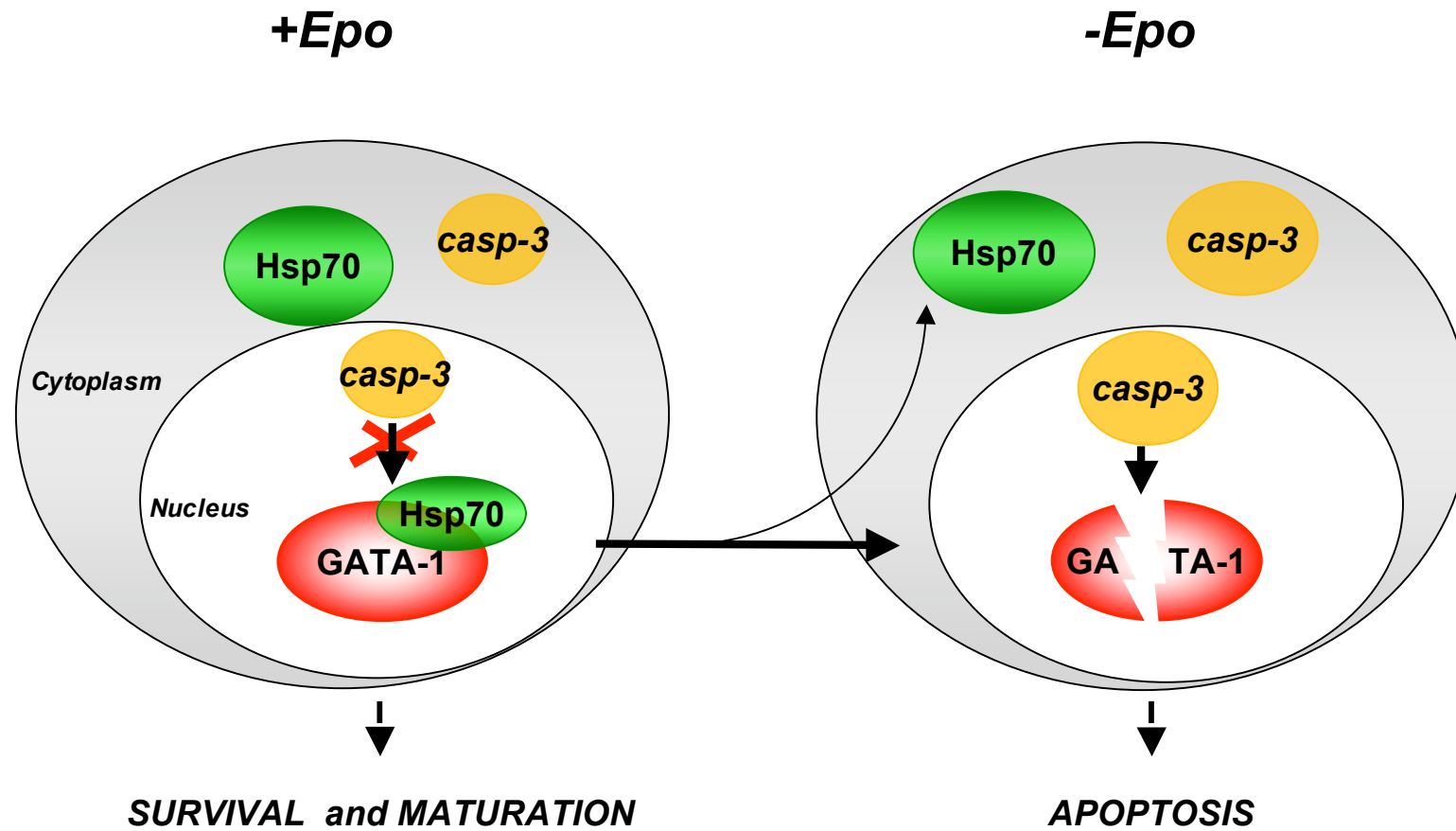


Fig.8S

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Quand ce travail de thèse a été initié, il avait été mis en évidence dans le laboratoire, que les caspases, enzymes responsables du programme de mort cellulaire, sont indispensables à la maturation des érythroblastes. L'hypothèse établie était que les caspases clivent des protéines responsables des changements morphologiques des érythroblastes incluant la condensation nucléaire (clivage de la Lamine B) et de la chromatine (clivage d'Acinus) (Zermati et al., 2001). En revanche, les caspases sont incapables de cliver le facteur de transcription GATA-1, protéine cible des caspases au cours de l'apoptose induite par privation en Epo des érythroblastes (De Maria et al., 1999b). Ainsi, au cours de la différenciation, alors même que les caspases sont activées, les cellules sont protégées de l'apoptose par un mécanisme qui restait à déterminer. Les molécules anti-apoptotiques comme Bcl-x_L ou les IAPs ne paraissent pas pouvoir être impliquées dans cette modulation de l'activité de la caspase-3 puisque les caspases sont activées et fonctionnelles. Dans le laboratoire, nous nous sommes donc intéressés aux mécanismes protégeant GATA-1 du clivage par la caspase-3.

Nous avons tout d'abord vérifié qu'au cours de la différenciation érythroïde terminale, la localisation de la caspase-3 activée est cytoplasmique et nucléaire. Ainsi GATA-1 et la caspase-3 activée colocalisent dans le noyau et l'absence de clivage de GATA-1 n'est pas due au fait que la caspase-3 est séquestrée dans un compartiment cellulaire différent du facteur de transcription.

La protéine chaperon Hsp70 est la seule molécule anti-apoptotique pour laquelle il a été évoqué que son rôle peut s'exercer en aval de l'activation de la caspase-3, par blocage de la fragmentation de l'ADN (Jaattela et al., 1998). Des membres de la famille Hsp70 ont été précédemment décrits au cours de l'érythropoïèse dans différentes espèces (Morimoto and Fodor, 1984) (Banerji et al., 1984) (Singh and Yu, 1984) (Davis et al., 1986) (Banerji et al., 1987) (Winning and Browder, 1988), dans les érythroblastes médullaires humains et certaines lignées cellulaires tumorales à différenciation érythroïde. Dans la lignée K562, la stimulation par l'hémine entraînerait l'expression et l'activation de HSF2 qui induit la synthèse d'Hsp70 au cours de la différenciation érythroïde terminale (Leppa et al., 1997; Singh and Yu, 1984).

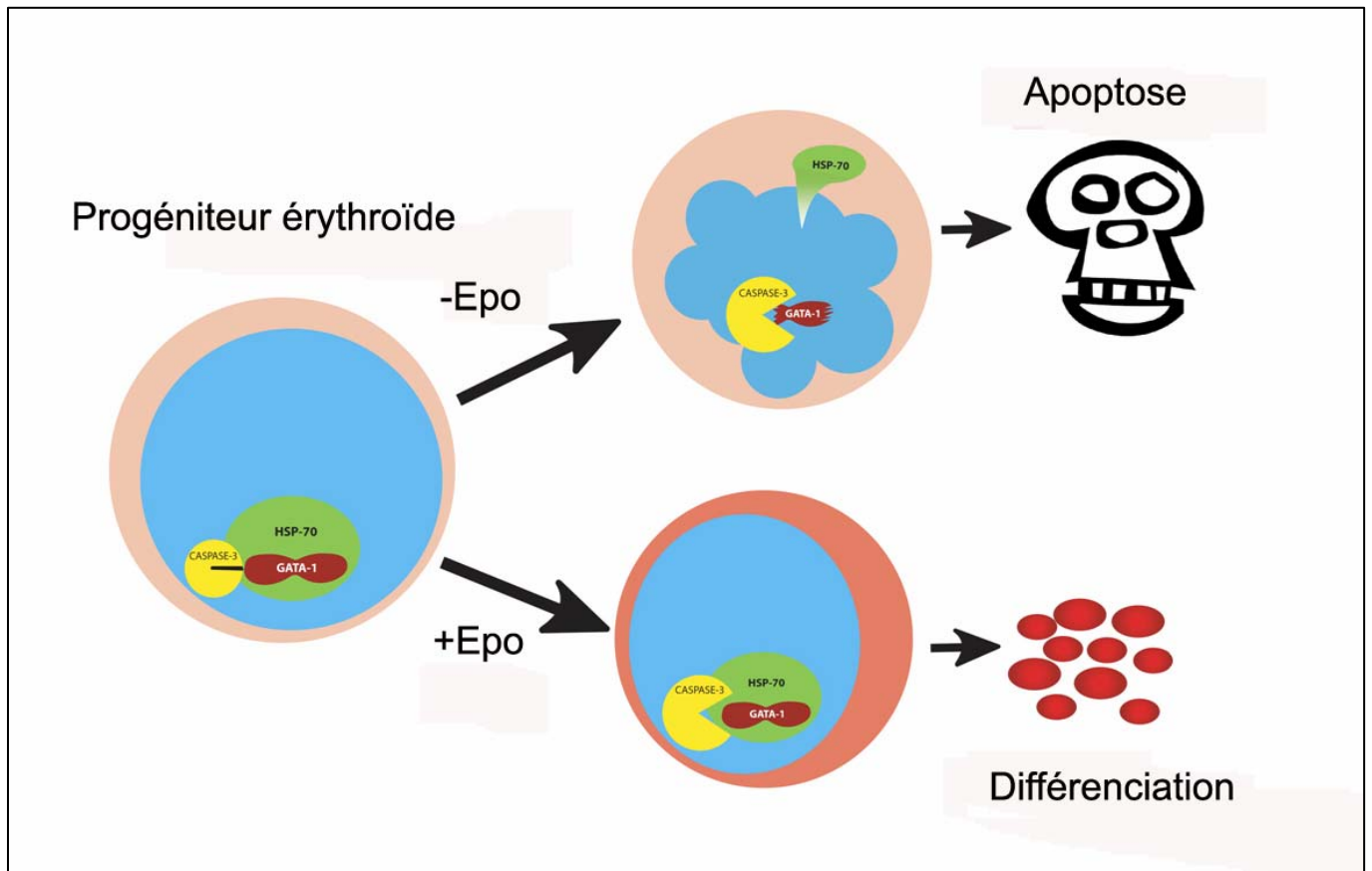


Figure D1 : La localisation d’Hsp70 détermine le sort de l’érythroblaste

Hsp70 est impliquée dans le mécanisme de protection de GATA-1 de la caspase-3 activée au cours de la différenciation érythroïde. La présence ou non d’Epo détermine la localisation nucléaire d’Hsp70 et ainsi le devenir de l’érythroblaste.

Dans ce travail de thèse nous avons étudié l'expression d'Hsp70A au cours de la différenciation érythroïde terminale dans un modèle de culture de cellules primaires humaines. Hsp70A étant la seule molécule anti-apoptotique connue pouvant agir en aval de la caspase-3 activée et inhiber son potentiel pro-apoptotique, nous avons proposé l'hypothèse qu'elle protégerait GATA-1, lors de la phase d'activation des caspases, observée au cours de la différenciation érythroïde terminale humaine (Figure Hypothèse).

Au cours de ce travail de thèse, j'ai pu ainsi confirmer que l'expression d'Hsp70A inductible est constitutive au cours de la différenciation érythroïde. Lors de la phase d'activation de la caspase-3, Hsp70 est exprimée à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme. Pendant l'apoptose induite par privation en Epo, Hsp70 reste exprimée dans le cytoplasme mais est indétectable dans le noyau, alors que l'activation de la caspase-3 est intense dans ces deux compartiments. Ainsi, en comparaison avec ce qui est observé au cours de la différenciation érythroïde, le ratio Hsp70/caspase-3 activée diminue de façon importante au cours de l'apoptose dans les différents compartiments cellulaires et en particulier au niveau nucléaire. La Leptomycine B est une drogue inhibant l'export des protéines présentant des motifs spécifiques d'export nucléaire (NES, « Nuclear Export Signal »). Nous avons complété les expériences de privation en Epo en ajoutant au milieu de culture cellulaire de la Leptomycine B, ce qui a eu comme effet d'inhiber l'export nucléaire d'Hsp70 et le clivage de GATA-1 alors que la caspase-3 était très fortement activée. Ces résultats suggèrent que le clivage de GATA-1 était possible du fait de l'absence d'Hsp70, et que la diminution du taux d'Hsp70 serait régulée par un phénomène d'export nucléaire *via* des motifs NES. Au moment où nous réalisons ces expériences, la présence de séquence NES dans la famille des protéines Hsp70 avait été décrite uniquement pour la molécule Ssb1p, homologue de Hsc70 chez *S. cerevisiae* (Shulga et al., 1999). Cependant, la protéine Hsc70 humaine est dépourvue de la région correspondant à la NES de Ssb1p (Tsukahara and Maru, 2004). Ce n'est que plus tard qu'une séquence NES fonctionnelle dans la région PBD d'Hsc70 humaine a été décrite (Tsukahara and Maru, 2004). Nos résultats confirmeraient donc que la séquence NES d'Hsp70A serait fonctionnelle dans notre modèle de culture de cellules primaires humaines, et que son activité serait régulée par la présence ou non d'Epo. De plus, nous avons remarqué que la localisation nucléaire d'Hsp70 au cours de la maturation des érythroblastes et sa colocalisation avec GATA-1 s'accroissent lors de la phase d'activation des caspases, ce qui est compatible avec un rôle protecteur d'Hsp70 des protéines intranucléaires. Nous avons également mis en évidence

que, lors de la différenciation érythroïde GATA-1 et Hsp70 co-immunoprécipitent dans le noyau, ce qui va dans le sens que Hsp70 protège GATA-1 du clivage par la caspase-3 activée. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de protéolyse de GATA-1 par la caspase-3 *in vitro* qui ont montré qu'Hsp70 inhibe de façon dose dépendante et spécifique la protéolyse de GATA-1 et confirme qu'Hsp70 pourrait être responsable de la protection de GATA-1 du clivage par la caspase-3 lors du processus de différenciation érythroïde. Nos résultats montrent que seule la région PBD d'Hsp70 est indispensable à cet effet. En revanche, le domaine de fixation de l'ATP n'est pas indispensable à cette fonction protectrice de GATA-1. Il restera à démontrer ultérieurement qu'il existe une interaction physique spécifique entre GATA-1 et le domaine de fixation peptidique d'Hsp70.

Pour prouver la spécificité du rôle d'Hsp70, nous avons inhibé son expression au cours de la différenciation érythroïde par une approche siRNA. La transfection de siRNA Hsp70 réduit de façon significative l'expression nucléaire et cytoplasmique d'Hsp70. Cette diminution est associée au clivage de GATA-1 lors de la phase d'activation de la caspase-3 observée au cours de la différenciation des érythroblastes, et entraîne l'arrêt de maturation, la diminution significative des gènes dont l'expression est régulée par GATA-1 (Hémoglobine, Bcl-XL) ainsi qu'une augmentation de la mort cellulaire. Nous avons ensuite confirmé que l'apoptose induite par la diminution d'expression d'Hsp70 était bien due au clivage de GATA-1, en reversant ce phénomène apoptotique par l'expression d'un mutant de GATA-1 non clivable par la caspase-3 (μ GATA-1) (De Maria et al., 1999b). Les effets de l'inhibition d'Hsp70 sont abolis dans les cellules transduites par μ GATA-1. **Ces résultats démontrent donc le rôle majeur d'Hsp70 comme agent protecteur de GATA-1 du clivage par la caspases-3, au cours de la maturation érythroblastique.** Toutefois, nous ne pouvons exclure que, dans la lignée érythroïde, Hsp70 puisse avoir de surcroît un rôle, en dehors de la protection de GATA-1, en amont de l'activation de la caspase-3 dans le processus de survie et de différenciation (Beere et al., 2000) (Saleh et al., 2000).

Parallèlement à l'étude des conséquences de l'inhibition d'Hsp70 dans le contexte de cellules transduites par μ GATA-1, nous avons observé l'effet propre de l'hyperexpression de GATA-1 sur l'érythropoïèse. Nous avons pu observer qu'en présence d'Epo, l'hyperexpression de GATA-1 clivable ou non par la caspase-3, induit un arrêt de prolifération, confirmant les précédentes observations (Munugalavadla and Kapur, 2005). L'inhibition de la prolifération des cellules par l'hyperexpression de GATA-1 est en accord avec des études moléculaires et une analyse du

transcriptome qui montrent que GATA-1 régule le cycle cellulaire en induisant la synthèse d'inhibiteurs de la prolifération et la répression de gènes mitogènes (Rylski et al., 2003). Nous avons également observé qu'en absence d'Epo, l'expression de μ GATA-1 inhibe l'apoptose et l'arrêt de la différenciation. La privation en Epo induit donc l'apoptose et l'arrêt de différenciation par l'intermédiaire du clivage de GATA-1 (De Maria et al., 1999b). L'effet de l'expression de μ GATA-1 en l'absence d'Epo suggère que, la seule présence de GATA-1, en l'absence d'activation de la voie JAK/STAT, permettrait l'expression de gènes de différenciation érythroïdes (Gpa, Hémoglobine) et un niveau d'expression de Bcl-x_L ou d'autres protéines anti-apoptotiques suffisant pour empêcher la mort cellulaire.

Nous avons également vérifié que l'expression d'Hsp70 au cours de la différenciation érythroblastique n'était pas liée à un stress de culture *in vitro*, en analysant l'expression d'Hsp70 *in vivo* dans des moelles normales humaines provenant de donneurs sains. L'expression d'Hsp70 dans des érythroblastes matures provenant de moelle osseuse humaine normale, avait précédemment été décrite (Singh et al, 1984). Nous avons ainsi confirmé clairement que les cellules érythroblastiques expriment Hsp70 qui colocalise avec GATA-1. L'expression d'Hsp70 diminue fortement au stade réticulocytaire, ce qui confirme l'étude précédente montrant l'absence d'Hsp70 dans les érythrocytes (Singh and Yu, 1984). De façon intéressante, nous n'avons pas détecté d'Hsp70 dans la lignée granuleuse reconnue en microscopie confocale par la forme du noyau caractéristique des polynucléaires ; ce qui est compatible également avec les observations de Singh et al réalisées après séparation des différents éléments médullaires par PERCOLL. Cette donnée est entièrement compatible avec des résultats précédemment obtenus dans le laboratoire montrant une absence d'activation des caspases au cours de la différenciation des neutrophiles (B Joly, données du labo non publiées). Par ailleurs, il serait intéressant d'analyser l'expression d'Hsp70 dans les lignées mégacaryocytaire et monocyttaire-macrophagique qui utilisent, au même titre que la lignée érythroblastique, les caspases au cours de leur différenciation terminale (De Botton et al., 2002) (Sordet et al., 2002b).

Pour conclure, nos résultats démontrent le rôle majeur d'Hsp70 au cours de la différenciation érythroïde terminale humaine. Ces résultats confirment, sur un modèle de cellules primaires humaines, le rôle anti-apoptotique d'Hsp70, en aval de la caspase-3 activée. Nos travaux confirment notre hypothèse qu'Hsp70 est impliquée dans le mécanisme de protection sélective des substrats (comme GATA-1) de la caspase-3 activée au cours de la différenciation érythroïde et ouvrent des perspectives pour les autres modèles de

différenciation impliquant l'activation des caspases (cf. II.A.4.1.). De plus, nous avons décrit que ce nouveau rôle d'Hsp70 est régulé par l'Epo, ce qui accroît le champ du potentiel anti-apoptotique de cette molécule et de ces utilisations thérapeutiques éventuelles en hématologie où sur d'autres types cellulaires exprimant Epo-R à leur surface comme les cellules neuronales ou les cardiomyocytes par exemple (cf. I.D.1.1.2.2.1.) (Figure D1).

A partir de ce travail de nombreux axes de recherche sont à poursuivre pour préciser le rôle des Hsp au cours de l'érythropoïèse :

1) Régulation de l'expression d'HSF2 par l'Epo au cours de l'érythropoïèse.

L'activation d'HSF2 semble essentielle à la différenciation érythroïde des K562. Il a précédemment été décrit que l'induction de la différenciation de ces cellules par l'hémine active HSF2 et sa fixation sur le promoteur du gène *Hsp70*, qui s'accompagne de l'expression d'Hsp70 et l'accumulation de globine (Sistonen et al., 1992) (Singh and Yu, 1984) (Leppa et al., 1997).

En plus des sites HSE, plusieurs séquences régulatrices agissant en cis, dont une séquence GATA ont été retrouvées dans la région promotrice du gène *hsp70* (Banerji et al., 1987) (Taira et al., 1999). Dans *T. thermophila* l'association des motifs GATA et HSE est nécessaire pour l'induction de transcription d'Hsp70-1 (Barchetta et al., 2008).

Il serait intéressant d'étudier si, dans le système de culture de cellules primaires que nous avons utilisé, l'Epo a un rôle similaire sur l'activation d'HSF2 et GATA-1 sur l'expression d'Hsp70.

2) Détermination des mécanismes moléculaires par lesquels l'Epo maintient Hsp70 dans le noyau au cours de la différenciation.

2.a) Le site d'export nucléaire NES.

Le NES classique d'Hsc70 a été décrit récemment dans un modèle de lignée cellulaire tumorale COS (Tsukahara and Maru, 2004). Nous chercherons à individualiser chez l'Homme le site d'export nucléaire potentiel dans la partie N-terminale d'Hsp70 et à mettre en évidence sa fonctionnalité dans notre modèle de différenciation érythroïde terminale après la réalisation de mutants ponctuels. Nous déterminerons si la mutation de la séquence NES permet le maintien d'Hsp70 dans le noyau et la protection de GATA-1 alors que les caspases sont activées en l'absence d'Epo.

2.b) Influence de la transduction du signal induit par l'activation d'Epo-R sur Hsp70.

L'activation d'Epo-R a pour conséquence l'accumulation nucléaire d'Hsp70 au cours de la différenciation érythroïde terminale. Il est nécessaire d'explorer quel(s) sont les voie(s) et

mécanisme(s) impliqués dans cet effet sur la localisation d'Hsp70 et ce nouveau rôle anti-apoptotique de l'Epo.

Il sera intéressant d'analyser si sur la région NES potentielle, il existe des sites de phosphorylation ou d'interaction avec des protéines jouant un rôle dans la transduction du signal du récepteur à l'Epo.

Il sera également intéressant d'étudier si la propriété d'inhibition de la voie Raf-1/ERK par Hsp70 (Song et al., 2001) (Gotz et al., 2004) se vérifie dans la lignée érythroïde. Ainsi la transposition de ces résultats d'inhibition de la voie Raf-1/ERK par Hsp70 au cours de différenciation érythroïde pourrait faire envisager un lien paradoxal entre l'expression d'Hsp70 et l'activation de la caspase-3 induite par l'augmentation de l'expression de Fas secondaire à la diminution de l'activité de la voie Raf-1/ERK (cf. chapitre II.A.4.1.1.1.)

3) Etude du rôle des autres Hsp au cours de la différenciation érythroïde terminale.

Au cours de ce travail, nous avons pu mettre en évidence, qu'hormis Hsp70, d'autres Hsp sont exprimées par les érythroblastes au cours de leur différenciation. Dans ce travail nous nous sommes focalisés sur Hsp70 car c'est la seule Hsp pour laquelle nous avons observé une localisation dans le noyau et ainsi des interactions avec des protéines nucléaires. Les rôles d'Hsp27 et Hsp90 au cours de l'érythropoïèse apparaissent comme d'autres champs d'investigation.

4) Etude du rôle d'Hsp70 dans les pathologies de l'érythropoïèse.

4.a) Maladie de Vaquez.

Enfin, nos résultats pourront trouver des applications majeures dans les pathologies de l'érythropoïèse. Il serait intéressant d'analyser si l'activité constitutive de la voie Jak/Stat dans les polyglobulies de Vaquez en l'absence d'Epo permet le maintien d'Hsp70 dans le noyau. Les érythroblastes de ces patients sont moins sensibles aux stimuli apoptotiques (Pahl, 2000). L'activation constitutive de la voie Jak/Stat de ces érythroblastes permet l'hyperexpression de Bcl-x_L (cf. I.D.1.2.2.1.3.1) (Silva et al., 1998). En outre, la surexpression de Bcl-x_L dans des cellules CD34⁺ humaines permet d'obtenir une prolifération et une différenciation érythroïde en absence d'Epo, superposable à ce qui est observé chez les patients atteints de Maladie de Vaquez. Cet effet semble moins important que celui de la surexpression de STAT5, **ce qui semble suggérer que d'autres cibles de STAT5 pourraient être impliquées dans le mécanisme physiopathologique de ces polyglobulies** (Garcon et al., 2006). Il serait intéressant de vérifier

l'hypothèse que la voie Jak/Stat pourrait permettre le maintien d'Hsp70 dans le noyau en plus de son rôle d'induction de l'expression de Bcl-x_L.

4.b) Myélodysplasie.

Il serait également intéressant d'étudier l'éventuel rôle d'Hsp70 dans les phénomènes dysérythropoïétiques observés dans les syndromes myélodysplasiques (MDS) ou les hémoglobinopathies.

Les MDS, encore appelés anémies réfractaires, constituent un groupe hétérogène d'hémopathies clonales caractérisées par une hématopoïèse inefficace, avec apoptose prématurée des précurseurs myéloïdes avant qu'il n'aboutissent à des cellules sanguines matures (Bogdanovic et al., 1997; Raza et al., 1995). Il en résulte des cytopénies sanguines (anémie arégénérative et habituellement macrocytaire, neutropénie, thrombopénie) contrastant avec une moelle le plus souvent riche, où les précurseurs myéloïdes sont morphologiquement anormaux (« dysmyélopoïèse »). Les MDS, qui peuvent rester à un état chronique durant des années, évoluent fréquemment en leucémie aiguë myéloblastique et constituent le plus fréquemment des états préleucémiques (Mufti and Galton, 1986). Nos expériences d'inhibition de l'expression d'Hsp70 après transfection de siRNA, nous ont permis de mettre en évidence un aspect apoptotique des érythroblastes lors de la phase d'activation des caspases, évoquant aux cytologistes des aspects observés chez certains patients atteints de MDS. L'analyse de l'expression des gènes des cellules CD34⁺ médullaires de patients a permis de souligner une diminution de la synthèse d'un membre de la famille Hsp70 (HspA4) dans les MDS à faible risque de transformation leucémique, qui sont caractérisés par un taux de cellules apoptotiques élevé (Hofmann and Koeffler, 2002). Il a été mis en évidence que l'invalidation de l'Hsp70 mitochondriale Hspa9b dans un modèle de zebrafish induit une anémie avec une dysérythropoïèse caractérisée par un excès d'apoptose, mimant des aspects pathologiques observés chez l'homme dans les myélodysplasies (Craven et al., 2005). Une étude des cellules médullaires par cytométrie de flux de patients atteints de MDS, a suggéré que les MDS à faible risque de transformation leucémique auraient une moindre expression des Hsp (Duval et al., 2006). Ces résultats seront confirmés, en particulier par des études de la localisation cellulaire d'Hsp70 : notre hypothèse étant qu'il y aurait un défaut de localisation nucléaire d'Hsp70 dans certaines MDS induisant l'apoptose des érythroblastes, au moment de la phase d'activation des caspases.

4.c) Hémoglobinopathies.

Dans les hémoglobinopathies également et plus particulièrement dans les β -thalassémies, une érythropoïèse inefficace fait partie du mécanisme physiopathologique de l'anémie (Schrier, 2002). Dans les β -thalassémies, définies par un déficit de synthèse, partiel ou total de la chaîne β de l'hémoglobine, plusieurs études ont montré que cette dysérythropoïèse était due à un excès d'apoptose (Yuan et al., 1993a) (Mathias et al., 2000) (Centis et al., 2000) (yuan et al, 1993). Dans les β -thalassémies, la majorité des érythroblastes apoptosent au stade polychromatophile où l'hémoglobination et l'activation de la caspase-3 sont intenses. Notre hypothèse serait que l'excès de chaînes d' α -globine ou de protéines altérées par les ROS (« Reactive Oxygen Species ») fixeraient toutes les Hsp disponibles, dont Hsp70 qui ne pourrait alors pas protéger GATA-1 du clivage par les caspases.

Ainsi, dans ces différents modèles de dysérythropoïèse nous pourrions évaluer l'effet bénéfique, sur la différenciation érythroïde terminale des érythroblastes de ces patients, de l'expression d'Hsp70 muté dans sa séquence NES qui serait alors séquestrée dans le noyau ou du mutant μ GATA-1 non clivable par la caspase-3.

Tous ces différents axes de recherche permettront de compléter ce travail qui a permis de mettre en évidence que Hsp70 est une nouvelle protéine anti-apoptotique majeure de l'érythropoïèse dont la modulation apparaît être une nouvelle voie thérapeutique en hématologie et autres domaines.

ANNEXES

ANNEXE I

ARTICLE 2

Hsp70, l'ange gardien de GATA-1 lors de la différenciation des globules rouges

**Julie Vandekerckhove, Jean-Antoine Ribeil, Yaël Zermati, Carmen Garrido, Geneviève
Courtois, Eric Solary, Olivier Hermine**

Médecine Sciences. 2008, 24, 37-39

Hsp70, l'ange gardien de GATA-1 lors de la différenciation des globules rouges

Julie Vandekerckhove, Jean-Antoine Ribeil, Yaël Zermati, Carmen Garrido, Geneviève Courtois, Eric Solary, Olivier Hermine

J. Vandekerckhove, J.A. Ribeil, G. Courtois O. Hermine : CNRS UMR 8147 et Département d'Hématologie, Faculté de Médecine et Université René Descartes Paris V, Hôpital Necker, 75743 Paris Cedex 15, France.
Y. Zermati : Département d'hématologie, Institut Cochin, Paris, France.
C. Garrido, E. Solary : Inserm, UMR 517, 21079 Dijon, France.
hermine@necker.fr



➤ L'érythropoïèse est le processus permettant la production des globules rouges matures à partir de cellules souches hématopoïétiques, et il est finement régulé par l'effet combiné du microenvironnement médullaire -au sein de structures appelées îlots érythroblastiques- et par des facteurs de croissance. Ce programme de différenciation est en grande partie sous le contrôle du facteur de transcription GATA-1. Celui-ci active la transcription de gènes érythroïdes, comme ceux qui codent pour la glycophorine, les chaînes de l'hémoglobine et le récepteur de l'érythropoïétine (EpoR) ainsi que le gène de survie *BclX_L*.

Les progéniteurs érythroïdes les plus précoces appelés BFU-E (*burst forming unit-erythroid*), ainsi nommés parce que *in vitro* en milieu semi-solide, ces progéniteurs produisent des colonies éclatées en multiples agrégats, requièrent la présence de *stem cell factor* (SCF) et d'érythropoïétine (Epo) [1] ; ils donnent naissance aux progéniteurs CFU-E (*colony-forming unit-erythroid*) qui eux, sous le contrôle strict de l'Epo, vont se différencier en cellules morphologiquement identifiables de la lignée érythroblastique, les proérythroblastes. Ces proérythroblastes vont ensuite se différencier successivement en érythroblastes basophiles, polychromatophiles et acidophiles. L'énucléation de l'érythroblaste acidophile donne naissance aux réticulocytes qui mûrissent finalement en globules rouges (Figure 1). Le SCF et l'Epo sont les deux cytokines principales nécessaires à la production des globules rouges. La production d'Epo est régulée par l'oxygénation rénale, permet-

tant ainsi le contrôle de la production de globules rouges. La baisse du taux d'Epo va diminuer les signaux de prolifération et surtout induire l'apoptose des érythroblastes et ainsi diminuer la production des globules rouges. Par ailleurs il a été montré que les érythroblastes immatures expriment à leur surface le récepteur de mort Fas, alors que les plus matures expriment Fas-L [2]. Ainsi au sein de l'îlot érythroblastique, les érythroblastes les plus matures interagissent avec les plus immatures et induisent l'activation de Fas, ce qui a pour conséquence l'activation des caspases.

Implication de la caspase 3 dans l'apoptose des érythroblastes et le contrôle de l'érythropoïèse

L'apoptose des érythroblastes est dépendante des caspases, et, de ce fait, les caspases et en particulier la caspase-3, enzyme principale effectrice de l'apoptose,

jouent un rôle majeur dans la régulation de l'érythropoïèse. En effet, l'absence d'activation de la voie Jak2/STAT5 normalement induite par le récepteur de l'Epo conduit à une diminution de l'expression de *BclX_L*, diminution responsable de la dépoliarisation de la mitochondrie et de l'activation de la caspase 9 au sein de l'apoptosome, qui elle-même va activer la caspase 3. Au cours de ce processus apoptotique, la caspase-3, en clivant GATA-1, entraîne une amplification de la diminution d'expression de *BclX_L* (en diminuant l'effet transactivateur de GATA-1 sur le gène codant *BclX_L*) et également un arrêt de maturation (en diminuant l'effet transactivateur de GATA-1 sur les gènes codant les gènes de la différenciation érythroïde). L'activation de Fas va induire l'activation de la caspase 8, qui elle va cliver la protéine bid en tbid, qui induit une dépoliarisation de la mitochondrie. À ce niveau, l'Epo,

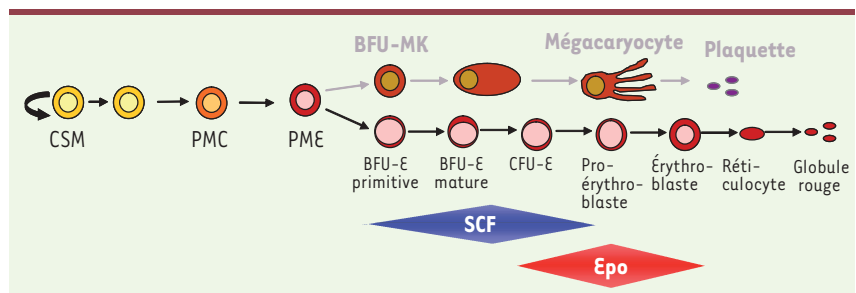


Figure 1. L'érythropoïèse est le processus permettant la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en globules rouges matures. La dépendance en érythropoïétine débute au stade BFU-E et s'arrête au stade proérythroblaste, le SCF débute son action en amont. L'expression des marqueurs de surface utilisés pour caractériser les différents précurseurs érythroïdes est indiquée. CSH : cellule souche hématopoïétique ; PMC : progéniteur myéloïde commun ; PME : progéniteur commun mégacaryocyte-érythrocyte ; CFU-E : *colony-forming unit-erythroid* ; BFU-E : *burst-forming unit-erythroid*.

en augmentant les taux de BclX_L permet de contrôler l'apoptose et le clivage de GATA-1. Ainsi, en fonction des taux relatifs de Fas-L et d'Epo, les érythroblastes vont survivre et se différencier (Epo > Fas-L), vont survivre mais être bloqués dans leur maturation (Fas-L = Epo), ou vont entrer en apoptose et arrêter leur maturation (Fas-L > Epo).

La similitude de certains changements morphologiques s'opérant au cours de la différenciation érythroïde terminale et de l'apoptose (condensation nucléaire, condensation de la chromatine, condensation cytoplasmique, perte d'organites) nous a conduit à faire l'hypothèse que les caspases pourraient être également impliquées dans le processus de différenciation érythroblastique. Nous avons ainsi montré que la caspase-3 est activée par la caspase 9, probablement en raison d'une expression constitutive de Bax dans les érythroblastes (J. Vandekerckhove et G. Courtois, données non publiées), et que cette activation est nécessaire à la maturation terminale des érythroblastes [3]. Elle clive, comme au cours de l'apoptose, la lamine B et acinus (une protéine activée par clivage), entraînant respectivement la condensation du noyau et de la chromatine des érythroblastes. Cependant, contrairement à ce qui se produit au cours de l'apoptose, le facteur de transcription GATA-1 n'est pas clivé par la caspase-3 au cours de la différenciation érythroïde

terminale. Ainsi, la régulation de l'érythropoïèse est non seulement liée au niveau d'activation des caspases mais aussi, en aval de cette activation, à l'accessibilité de leurs cibles.

Hsp 70 protège GATA-1 de la dégradation

Pour expliquer les mécanismes régulant le choix entre apoptose et différenciation, nous avons fait l'hypothèse que la protéine de choc thermique Hsp70 pourrait être impliquée dans la régulation de l'accessibilité des caspases à leurs cibles. Les érythroblastes expriment de façon constitutive la protéine de choc thermique Hsp70. Cette protéine agit habituellement en chaperonnant les protéines dénaturées par la chaleur pour leur permettre de reprendre leur conformation native. Au cours de la différenciation érythroblastique, Hsp70 est exprimée de façon constitutive et se localise dans le noyau où elle interagit avec GATA-1. À ce niveau, elle protège ce facteur du clivage par la caspase-3 [4]. En accord avec le rôle d'Hsp70 comme protéine protectrice de GATA-1, le sevrage en Epo, qui induit l'apoptose, s'accompagne de la sortie nucléaire d'Hsp70, ce qui permet alors à la caspase 3 de cliver GATA-1 et d'induire une augmentation de l'activation des caspases et l'apoptose. Ainsi, l'Epo protège les cellules érythroïdes en cours de différenciation du clivage de GATA-1 par

la caspase-3 en assurant le maintien de la localisation nucléaire de Hsp70. Il reste à élucider les mécanismes par lesquels l'Epo induit la rétention d'Hsp70 dans le noyau, et pourquoi l'ADN n'est pas clivé au cours de la différenciation érythroïde. Dans le modèle que nous proposons, les caspases seraient activées au cours de la différenciation érythroïde et sont indispensables à la maturation terminale. Le devenir de l'érythroblaste, entre différenciation et apoptose, ne serait plus uniquement sous le contrôle du niveau d'activation des caspases, mais aussi sous le contrôle de l'expression et de la localisation nucléaire d'Hsp70. L'expression d'Hsp70 pourrait être sous le contrôle de GATA-1, mais aussi de l'hypoxie, ce qui constituerait un niveau supplémentaire de contrôle des globules rouges au niveau médullaire [5]. Ce système à la fois complexe mais rapide permettrait de réguler de façon fine et coordonnée le taux de fabrication des globules rouges simplement en contrôlant le passage nucléocytoplasmique d'Hsp70.

Un rôle plus large pour Hsp70 dans le processus tumoral ?

Ce modèle pourrait s'appliquer à d'autres types cellulaires nécessitant l'activation des caspases pour leur différenciation terminale comme les kératinocytes, les cellules du cristallin, les cellules musculaires, les mégacaryocytes lors de la formation des plaquettes ou encore les monocytes lors de leur différenciation en macrophages [5, 6, 7-10].

La compréhension des mécanismes d'expression constitutive d'Hsp70 au cours de l'érythropoïèse, et des processus de signalisation par lesquels le récepteur de l'Epo induit la localisation nucléaire d'Hsp70, pourrait apporter des éclaircissements sur les mécanismes de diverses pathologies érythroïdes, telles que certaines polyglobulies ou à l'inverse certaines myélodysplasies. En effet, dans les polyglobulies qui ne sont pas associées à des mutations de la kinase Jak2 [11], une activation constitutive de la voie de signalisation responsable du maintien d'Hsp70

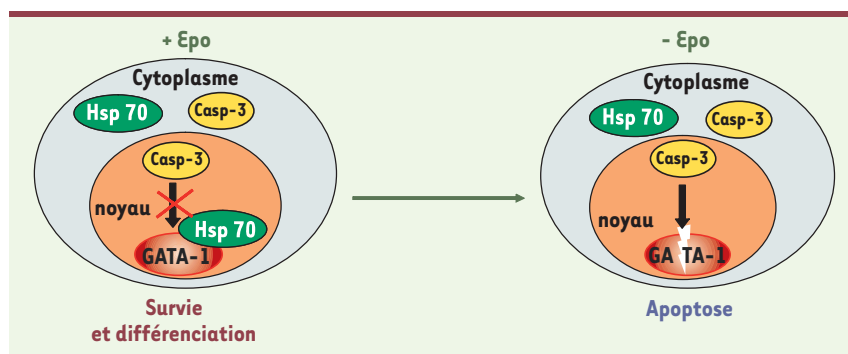


Figure 2. Modèle de la protection de GATA-1 du clivage par la caspase-3 par Hsp70 au cours de la différenciation érythroblastique. L'Epo permet le maintien de la localisation nucléaire d'Hsp70, ce qui protège GATA-1 du clivage par la caspase-3. En l'absence d'Epo, Hsp70 est délocalisée vers le cytoplasme et la caspase-3 peut alors cliver GATA-1, ce qui entraîne l'arrêt de différenciation et l'apoptose des progéniteurs érythroblastiques.

ARTICLE 3

L'érythropoïèse : un paradigme pour l'étude du rôle des caspases dans la mort et la différenciation cellulaire.

Jean-Antoine Ribeil , Yaël Zermati, Julie Vandekerckhove, Michaël Dussiot, Joelle Kersual, Olivier Hermine

Journal de la Société de Biologie. 2005, 199, 219-231

L'érythropoïèse : un paradigme pour l'étude du rôle des caspases dans la mort et la différenciation cellulaire

par J. A. Ribeil, Y. Zermati, J. Vandekerckhove, M. Dussiot, J. Kersual & O. Hermine

CNRS UMR 8147 et Département d'Hématologie, Faculté de Médecine et Université René Descartes Paris V, Hôpital Necker, France, 75743 Cedex 15.

Correspondant : Olivier Hermine. Tél. : 01 44 49 53 86. Fax : 01 44 49 06 76. E-mail : hermine@necker.fr

Reçu le 12 mai 2005

RÉSUMÉ

La différenciation érythroïde est sous la dépendance du facteur de transcription GATA-1 qui régule l'expression des gènes érythroïdes (hémoglobine, glycophorine, récepteur à l'érythropoïétine) et de l'érythropoïétine. La différenciation érythroïde terminale est caractérisée par des modifications morphologiques comprenant une réduction progressive du volume cellulaire et du noyau associée à une condensation marquée de la chromatine. Les changements morphologiques sont en partie comparables à ceux qui sont observés au cours de l'apoptose. La production de globules rouges dépend du taux d'apoptose des progéniteurs et des précurseurs érythroïdes. La privation en érythropoïétine ou l'induction de la voie Fas aboutissent à l'activation de la caspase-3, ce qui a pour conséquence la protéolyse de GATA-1, l'arrêt de maturation et l'apoptose des érythroblastes immatures. Récemment nous avons mis en évidence qu'en

présence d'érythropoïétine, l'activation de la caspase-3 est également indispensable aux modifications morphologiques caractéristiques observées au cours de la différenciation érythroïde terminale chez l'Homme. Les protéines clivées par les caspases, lors de l'érythropoïèse, comprennent la Lamine B et Acinus impliquées dans la condensation de la chromatine. Par contre, alors que la caspase-3 est activée, le clivage de GATA-1 et l'apoptose ne sont pas observées. Ainsi, le devenir des précurseurs érythroïdes est déterminé en aval de l'activation des caspases en fonction des substrats qu'elles clivent. Il semble donc qu'existent lors de l'érythropoïèse, des mécanismes de protection sélective des substrats vis à vis des caspases activées. Cette nouvelle fonction des caspases que nous décrirons dans cette revue pourrait jouer un rôle dans d'autres systèmes hématopoïétiques et non hématopoïétiques.

SUMMARY Erythropoiesis: a paradigm for the role of caspases in cell death and differentiation

Erythroid differentiation involves the transcription factor GATA-1 that positively regulates promoters of erythroid genes (including haemoglobin, glycophorin, erythropoietin receptor) and of erythropoietin. Terminal erythroid differentiation is characterized by major morphological changes that include chromatin condensation and cell size reduction. The morphological changes are partially similar at least to those observed during apoptosis. The production of red cells depends on the apoptosis rate of erythroid progenitors and precursors. Upon erythropoietin starvation or engagement of the death receptor Fas, caspases are activated in erythroid precursors and cleave GATA-1, thus inducing maturation arrest and apoptosis of immature erythroblasts. We have recently demonstrated that, upon erythropoietin sti-

mulation, caspase-3 was also activated, an event required for human terminal erythroblast maturation. Proteins cleaved by caspases in erythroid cells undergoing terminal differentiation include Lamin B and Acinus, which are involved in chromatin condensation. In contrast, despite caspase-3 activation neither GATA-1 degradation nor apoptosis was observed. Thus, the fate of erythroid precursors is determined downstream of caspase activation by the pattern of cleaved targets. Therefore, there are some mechanisms underlying the selective protection of caspase-3 targets during erythropoiesis. This model in which caspases activation is required for differentiation may apply to other haematopoietic or non haematopoietic cellular systems which are described in this review.

INTRODUCTION

L'érythropoïèse est un processus complexe qui aboutit à la formation de 100.10^9 globules rouges par jour. Elle a lieu chez l'adulte dans la moelle osseuse. La production de globules rouges dépend du taux d'apoptose des progéniteurs et des précurseurs érythroïdes. Elle est finement régulée pour permettre d'adapter la production aux besoins en oxygène des tissus périphériques. Récemment nous avons mis en évidence que l'activation d'une enzyme impliquée lors de l'apoptose, la caspase-3, est également indispensable aux modifications morphologiques caractéristiques observées au cours de la différenciation érythroïde terminale chez l'Homme (Zermati *et al.*, 2001). Dans ce contexte de différenciation, bien que la caspase-3 soit activée, il n'y a ni apoptose ni clivage du facteur de transcription GATA-1 qui est indispensable à la différenciation érythroïde terminale. L'objet de cette revue est de discuter, à travers le modèle de différenciation érythroïde terminale, les mécanismes physiologiques de différenciation cellulaire faisant intervenir les caspases.

L'ÉRYTHROPOÏÈSE : GÉNÉRALITÉS

Les érythrocytes de l'homme adulte normal proviennent d'une cellule souche hématopoïétique présomptive. Celle-ci va s'engager dans une voie de différenciation myéloïde, vers un progéniteur multipotent. Ce progéniteur appelé CFU-GEMM (pour Colony Forming Unit Granulocyte/Erythrocyte/Mégacaryocyte/Macrophage) va ensuite se différencier en un progéniteur restreint à la voie érythroïde appelé BFU-E (pour Burst Forming Unit Erythroid). Le BFU-E va proliférer et se différencier par étapes successives pour aboutir à la formation de précurseurs érythroblastiques morphologiquement reconnaissables au niveau médullaire (proérythroblastes et érythroblastes) et de globules rouges matures dans le sang circulant en environ trois semaines chez l'Homme (Gregory *et al.*, 1978) (Fig. 1). L'engagement des progéniteurs multipotents vers la voie érythroïde semble s'effectuer grâce à une combinaison d'expression de facteurs de transcription et en particulier du facteur GATA-1 qui permet la régulation positive des promoteurs des gènes érythroïdes comme la glycophorine A, l'hémoglobine, et le récepteur à l'éry-

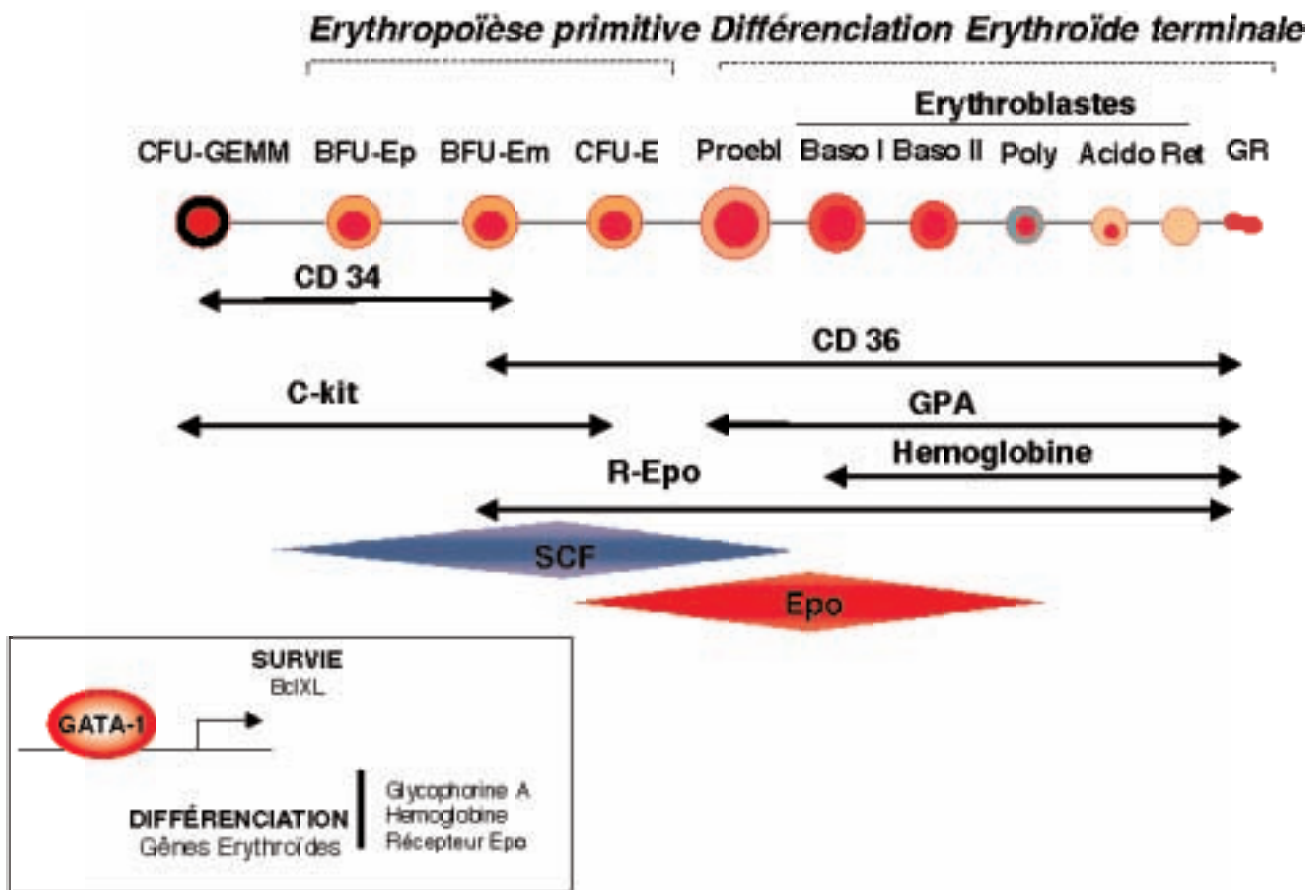


FIG. 1. –Schéma de l'érythropoïèse.

a) Antigène de différenciation, expression des deux principaux récepteurs régulateurs de l'érythropoïèse (c-kit, R-EPO). Niveaux d'action du Stem Cell Factor (SCF) et de l'érythropoïétine (EPO).

b) Gènes régulés par GATA-1 (Différenciation et survie).

thropoïétine. En son absence, la production de globules rouges est impossible. Des expériences sur des cellules souches embryonnaires (ES) invalidées pour le gène de GATA-1 ont montré que, dans les phases précoces, la protéine GATA-1 pouvait être remplacée par d'autres facteurs de transcription de la famille GATA tel que GATA-2 (Cantor *et al.*, 2002). Par contre, GATA-1 est absolument nécessaire dans les phases tardives de l'érythropoïèse, car cette protéine régule progressivement l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L (Fig. 1). Les différents progéniteurs érythroïdes ont été définis grâce à leurs caractéristiques de culture en milieux semi-solides. Les progéniteurs BFU-E vont donner de grosses colonies érythroïdes contenant plusieurs centaines de milliers d'érythroblastes matures, après vingt et un jours de culture chez l'Homme. Les progéniteurs plus avancés dans leur différenciation comme les BFU-E matures vont donner des colonies de plus petite taille en quatorze jours, alors que les CFU-E qui sont les progéniteurs les plus matures vont donner des colonies d'environ 30 à 60 érythrocytes en moins d'une semaine. Grâce à ces techniques en milieux semi-solides, les caractéristiques immunophénotypiques et les besoins en facteurs de croissance de ces différents progéniteurs ont pu être déterminés. Les progéniteurs les plus précoces expriment l'antigène CD34, et le récepteur au stem cell factor, c-kit. A partir du stade BFU-E, le récepteur à l'érythro-

poïétine commence à être exprimé avec un maximum d'expression au niveau des CFU-E. Les antigènes érythroïdes spécifiques, comme les antigènes des groupes sanguins, s'expriment au niveau des CFU-E ainsi que la glycophorine A. D'autres marqueurs non spécifiques permettent d'identifier ces progéniteurs comme par exemple le récepteur à la transferrine fortement exprimé à partir des BFU-E et l'antigène CD36 (également présent sur les mégacaryocytes et les monocytes matures) (Gregory *et al.*, 1978). De même, les facteurs de croissance nécessaires au développement de ces différents progéniteurs ont pu être déterminés. Pour la régulation positive, deux facteurs semblent être indispensables, le stem cell factor (SCF) pour les phases précoces jusqu'au stade CFU-E et l'érythropoïétine (Epo) à partir des BFU-E tardifs jusqu'au stade des érythroblastes (Koury *et al.*, 2002).

CYTOKINES RÉGULANT POSITIVEMENT L'ÉRYTHROPOÏÈSE

Stem Cell Factor

Le SCF est fabriqué par les cellules stromales de la moelle osseuse. Il existe sous une forme soluble et une forme trans-membranaire qui semble être prédominante

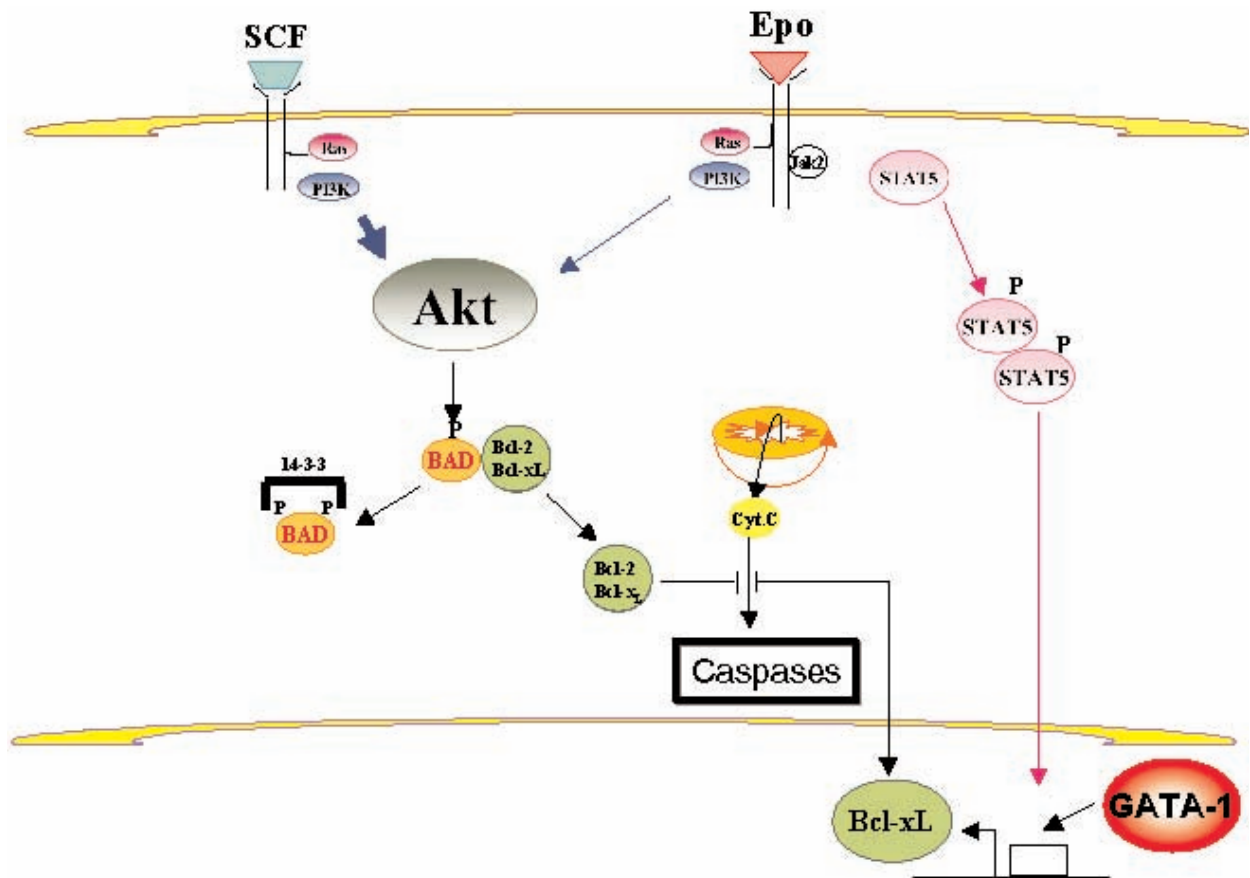


FIG. 2. – Synergie entre EPO et SCF pour la survie cellulaire.

pour la régulation de l'érythropoïèse puisque les souris n'exprimant que la forme soluble sont anémiques. Le SCF agit sur son récepteur c-kit, qui est un récepteur à tyrosine kinase, et va induire des signaux intracellulaires essentiellement de survie et de prolifération pour les progéniteurs érythroïdes. Il agit en synergie avec d'autres facteurs pour la prolifération, notamment avec le GM-CSF et l'interleukine 3. Il pourrait également augmenter la sensibilité des CFU-E à l'Epo. L'activation de la PI3-kinase par c-kit est sans doute une des voies principales pour augmenter la prolifération et la survie, par l'intermédiaire de la phosphorylation de la protéine AKT (voir plus loin) (Fig. 2). Actuellement, il n'y a aucun argument démontrant l'existence d'une régulation de la production de SCF en fonction de l'hypoxie tissulaire ou, à l'inverse, en fonction de l'hyperproduction de globules rouges. Son expression semble constitutive.

Érythropoïétine

L'érythropoïétine (EPO) est le facteur régulateur principal de l'érythropoïèse. Elle est produite par le rein et va agir au niveau de la moelle osseuse pour stimuler la production des globules rouges. Cette production de glo-

bules rouges va apporter de l'oxygène dans les cellules rénales qui vont alors diminuer leur synthèse d'EPO, ce qui aura pour conséquence la diminution en retour de la production de globules rouges. Il existe donc à ce niveau une véritable régulation endocrine, le rein étant la «glande» productrice et la moelle osseuse l'organe cible (Fig. 3). Ainsi physiologiquement on a pu retrouver une parfaite corrélation entre le taux d'hémoglobine et le taux d'EPO. Pour un taux d'hémoglobine normal d'environ 12 g/dl, le taux d'EPO circulant est d'environ 20 unités/l. Ce dernier va augmenter en fonction de la baisse du taux d'hémoglobine pour atteindre environ 200 unités/l, lorsque l'hémoglobine atteint 7 g/dl. Cette production est altérée de façon significative au cours de nombreuses pathologies à l'origine d'une anémie.

Régulation de la synthèse d'EPO par les cellules rénales

L'EPO est donc une hormone circulante qui gouverne la production de globules rouges. En réponse à l'anémie ou l'hypoxie, les taux circulants peuvent augmenter jusqu'à 1 000 fois. La régulation de la production d'EPO est donc cruciale. De nombreux travaux ont contribué à

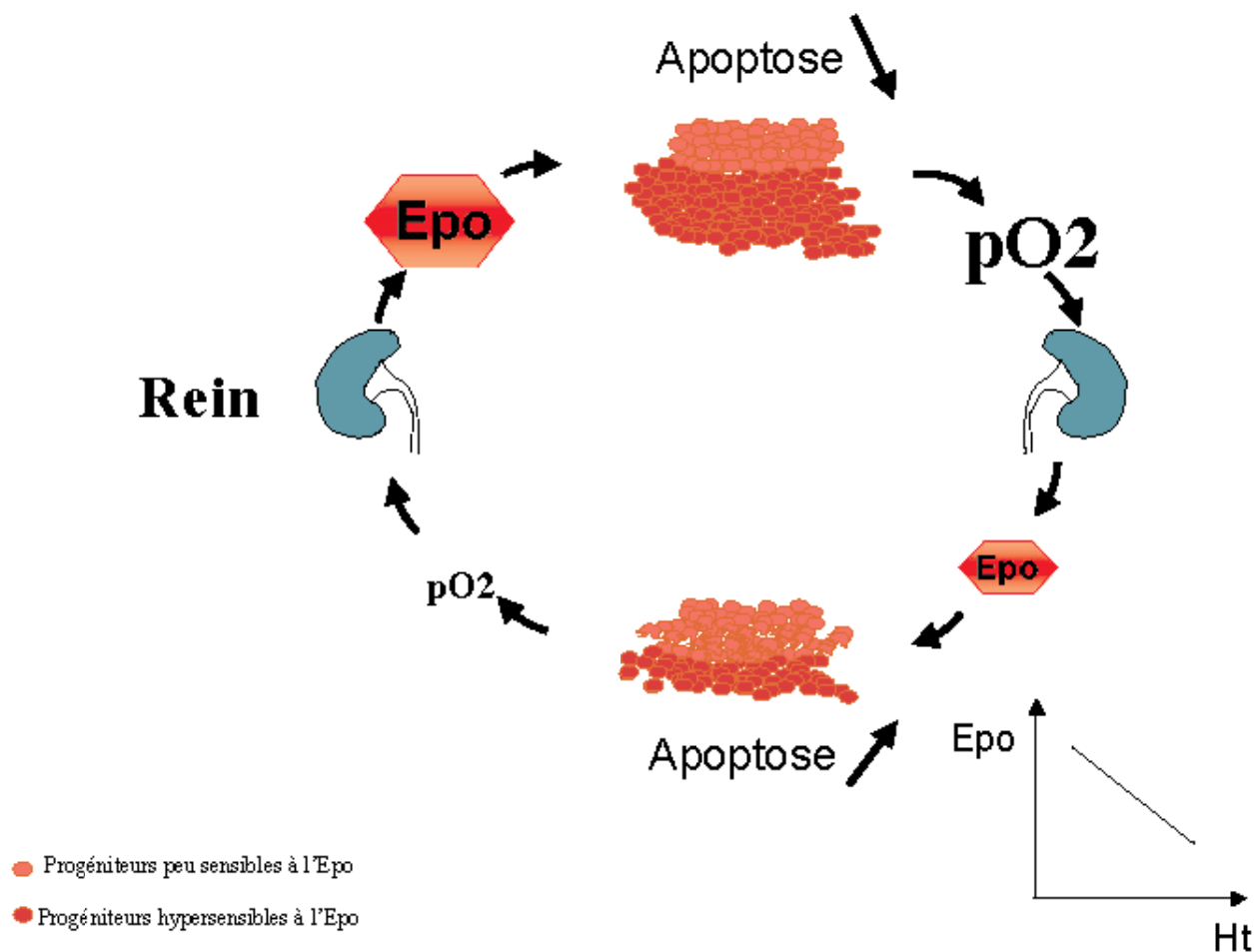


FIG. 3. – Régulation endocrine de l'érythropoïèse.

montrer que le rein est le principal lieu de production de l'EPO chez l'adulte. L'absence de réponse à l'anémie chez le sujet nephrectomisé en est la preuve par excellence. En plus du rein, le foie est capable de produire de l'EPO chez l'adulte, les cellules impliquées étant les hépatocytes et les cellules de Ito. Les mécanismes responsables de la sensibilité des cellules à l'hypoxie commencent à être mieux compris. Une somme considérable de travaux des dernières années a établi un rôle majeur pour les facteurs de transcription HIF (*Hypoxia inducible Factor*) dans cette fonction et ont fait l'objet de revues récentes (Brahimi-Horn *et al.*, 2005).

Mécanismes moléculaires de l'action de l'EPO au niveau des érythroblastes

Au niveau médullaire, l'EPO agit sur son récepteur situé sur les BFU-E et les CFU-E (Gregory *et al.*, 1978; Koury *et al.*, 2002). L'homodimérisation des récepteurs de l'EPO va aboutir au recrutement des protéines à activité tyrosine kinase telles que JAK2 qui vont alors phosphoryler en retour le récepteur et ses substrats. Il semble bien établi que les voies activées par le récepteur de l'EPO permettent la prolifération et la survie des cellules par l'intermédiaire de l'activation de la PI 3-Kinase, et sans doute des MAP kinases. Le récepteur à l'EPO activé recrute également les protéines STAT et en particulier STAT5A et STAT5B, qui vont être phosphorylées par la protéine JAK2. Ces protéines STAT5 une fois phosphorylées vont s'hétérodimériser, puis migrer dans le noyau pour augmenter l'expression de certains gènes. Actuellement, il n'y a pas de gène de différenciation érythroïde spécifiquement induit par STAT5. Par contre, STAT5 agit en synergie avec GATA1 pour augmenter l'expression de Bcl-x_L, augmentant ainsi la survie cellulaire (Fig. 2). Ainsi il semble que l'action principale de l'EPO soit d'augmenter la survie des progéniteurs érythroïdes (Koury *et al.*, 1990). Le modèle proposé actuellement est un modèle où les progéniteurs érythroïdes tardifs, essentiellement les CFU-E, auraient un seuil de sensibilité à l'EPO variable. Certains de ces progéniteurs seraient très sensibles à l'EPO et pourraient donc survivre en présence de faibles taux d'EPO, d'autres au contraire seraient très peu sensibles et nécessiteraient des taux élevés d'EPO pour survivre (Fig. 3). Les mécanismes définissant les niveaux de sensibilité de ces progéniteurs ne sont pas connus. On sait qu'ils ne sont pas liés à une variation du nombre de récepteurs ni à une variation de leur affinité. Ce modèle permettrait de rendre compte de la synergie existant entre le SCF et l'Epo. Le SCF, en activant fortement la PI 3-kinase, permettrait la phosphorylation d'AKT qui elle-même phosphorylerait des protéines telles que BAD, permettant ainsi la libération de la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L. De son côté l'EPO, en activant STAT5, permettrait d'augmenter l'expression de Bcl-x_L (Fig. 2). Ce schéma est sans doute trop simpliste et d'autres mécanismes moléculaires en jeu restent encore à découvrir.

La régulation positive de l'érythropoïèse se ferait essentiellement par inhibition de l'apoptose des progé-

niteurs et des précurseurs érythroïdes par l'intermédiaire de la modulation de la protéine Bcl-x_L. La prolifération et la différenciation s'effectueraient ensuite de façon non régulable une fois assurée la survie des progéniteurs. Il ne semble pas que le récepteur de l'EPO puisse envoyer des signaux spécifiques de différenciation. En effet, si l'on remplace les récepteurs de l'EPO par d'autres récepteurs de cytokines spécifiques d'autres lignages (G-CSF, Thrombopoïétine, Prolactine), la différenciation s'effectue normalement à partir du moment où la survie est possible.

RÔLE DES CASPASES DANS L'ÉRYTHROPOÏÈSE

Rôle des caspases dans la régulation négative de l'érythropoïèse

Pour éviter une trop forte production de globules rouges, l'érythropoïèse doit être régulée de façon négative. Cette régulation négative s'effectue essentiellement par le taux d'EPO circulante comme nous venons de l'expliquer. Plus récemment, il a été démontré que la régulation négative de l'érythropoïèse s'effectue par un mécanisme paracrine faisant jouer les récepteurs de mort tels que Fas. Dans ce modèle, il a été proposé que les érythroblastes en fin de différenciation (érythroblastes polychromatophiles et acidophiles) expriment Fas-Ligand et qu'au niveau de la moelle osseuse, au sein des îlots érythroblastiques composés d'un macrophage entouré d'érythroblastes à tous les stades de maturation, ils interagiraient directement avec les progéniteurs et les précurseurs érythroblastiques plus précoces exprimant le récepteur Fas pour induire l'arrêt de la maturation et l'apoptose. Ainsi le taux d'érythroblastes matures dans la moelle pourrait contrôler rétroactivement l'érythropoïèse en induisant l'apoptose des précurseurs érythroblastiques (De Maria *et al.*, 1999).

Pour rappel (Fig. 4), Fas-Ligand, en agissant sur son récepteur Fas, induit le recrutement de caspases, essentiellement la caspase-8 qui, elle-même, va activer en retour la caspase-3 pour induire le clivage des protéines nécessaires à la structure et à l'intégrité du noyau et de la chromatine. Cette activation de la caspase-3 va ainsi conduire à l'apoptose. De plus, l'activation de la caspase-8 clive et active la protéine Bid qui permet alors la dépoléarisation de la membrane mitochondriale. Une fois dépoléarisée, la mitochondrie va libérer du cytochrome c dans le cytoplasme, ce qui aboutit à la formation de l'apoptosome comprenant la pro-caspase-9 et le facteur Apaf-1. L'apoptosome va induire l'activation de la caspase-9 qui va cliver la caspase-3 et conduire également à l'apoptose par cette voie mitochondriale. Cette deuxième voie d'apoptose peut être inhibée par de forts taux de la protéine Bcl-x_L qui empêche la dépoléarisation de la mitochondrie. Au niveau de l'érythropoïèse, la protéine GATA-1 est une des cibles de la caspase-3. Son clivage va induire un arrêt de l'expression des gènes nécessaires à la maturation et induire ainsi un blocage de la différenciation érythroïde. De plus, le clivage de GATA-1 va

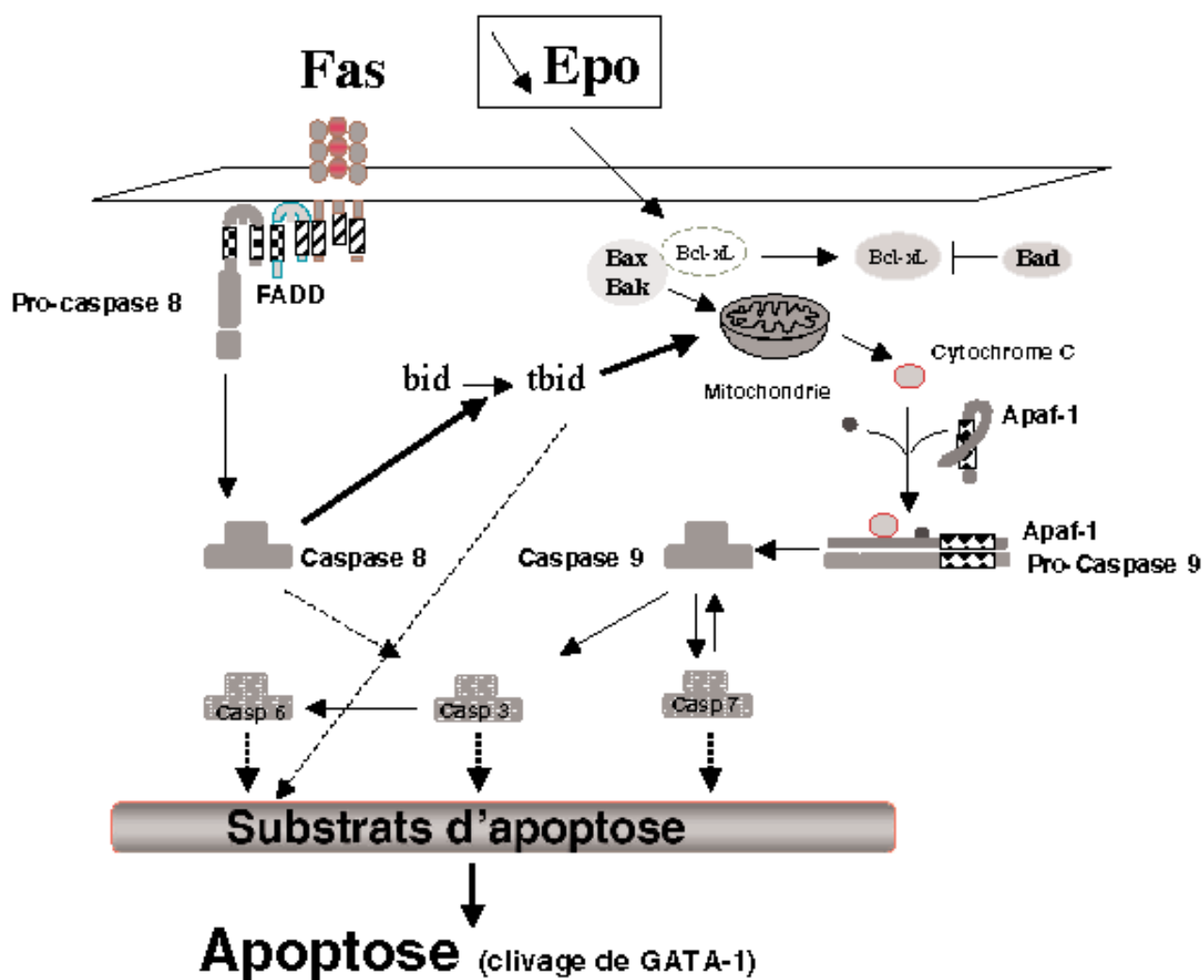


FIG. 4. – Mécanismes d'activation des caspases en l'absence d'EPO, ou en présence de Fas.

conduire à une diminution de l'activité du promoteur du gène de Bcl-x_L (De Maria *et al.*, 1999). Dans ce modèle faisant intervenir Fas/Fas-ligand, l'EPO pourrait agir en bloquant les effets apoptotiques de Fas-ligand. En effet, en augmentant les taux de Bcl-x_L, elle permettrait de bloquer la dépolarisation de la mitochondrie induite par Bid et ainsi de diminuer l'activation de la caspase-9 et de la caspase-3 et finalement de l'apoptose (Kroemer *et al.*, 1998). Dans ce modèle, il faut donc considérer que l'activation de la caspase-3, qui fait suite à l'activation de Fas, passe essentiellement par la voie mitochondriale (comme dans les hépatocytes) plutôt que directement par la voie de la caspase-8 (Fig. 4). Ainsi les caspases sont les enzymes clés de la régulation négative de l'érythropoïèse.

Rôle des caspases dans la maturation terminale des érythroblastes

Plusieurs observations indiquent que l'activation des caspases est impliquée dans le processus de maturation

érythroïde et pourrait jouer un rôle important dans ce phénomène. Une première étude a montré que les caspase-1, -2, -3, -5, -6, -7, -8, et -9 sont exprimées dans les cellules érythroïdes [10]. Les taux de procaspase-2, -3 et -8 sont nettement plus élevés dans les érythroblastes immatures que dans les érythroblastes matures (Gregoli *et al.*, 1999). Récemment, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle les caspases pourraient être activées au cours de l'érythropoïèse normale et expliquer les changements morphologiques observés au cours de la maturation terminale. Nous avons pu mettre en évidence que la caspase-3 est activée de façon transitoire au moment où les changements morphologiques des érythroblastes apparaissent (Zermati *et al.*, 2001). Cette activation se fait par la voie mitochondriale avec dépolarisation de sa membrane et activation de la caspase-9 (Zermati *et al.*, 2001). Nous avons également montré que l'activation de la caspase-3 est associée à l'activation de la caspase-6 et au clivage de la Lamine B, qui pourrait être responsable de la condensation nucléaire comme cela a été décrit au

cours de l'apoptose. De plus la protéine Acinus, responsable de la condensation de la chromatine mais pas de sa dégradation, est activée par clivage par la caspase-3 au cours de la différenciation érythroblastique. À l'inverse, bien que les caspases effectrices soient activées, les cellules n'entrent pas en apoptose puisqu'elles n'expriment pas de phosphatidyl sérines à leur membrane, et ICAD l'inhibiteur de CAD, nucléase responsable du clivage du DNA, n'est pas clivée, et GATA-1 n'est pas dégradée (Fig. 5) (Zermati *et al.*, 2001). L'addition d'un inhibiteur des caspases comme le z-VAD à la culture érythroïde juste avant la phase d'activation des caspases entraîne un blocage de la différenciation érythroïde au stade basophile (Zermati *et al.*, 2001). Cette observation a été récemment confirmée et approfondie par la démonstration du rôle essentiel de la caspase-3 dans la différenciation érythroïde à l'aide d'une stratégie d'inhibition spécifique de cette protéase par ARN interférence (siRNA) (Carlile *et al.*, 2004). Ces données ont aussi été confirmées dans les érythroblastes murins (Kolbus *et al.*, 2002). Dans ce modèle, il a été montré que l'hyper-

expression de Raf-1, qui prévient l'activation des caspases, empêche la maturation érythroïde en inhibant la différenciation induite par les caspases. Un phénomène opposé est observé chez les souris *Raf1^{-/-}* (Kolbus *et al.*, 2002). En plus des caspases, une étude récente suggère un rôle possible de p53 pendant les dernières étapes de la différenciation érythroblastique. Une expression importante de p53 est observée dans les érythroblastes acidophiles : cette activation de p53 pourrait être liée à la dégradation nucléaire qui a lieu dans ces cellules, sans l'exécution complète du processus apoptotique (Peller *et al.*, 2003).

Ainsi, le destin (apoptose versus différenciation) des précurseurs érythroïdes se décide en aval de l'activation de la caspase-3. Le passage apoptose versus différenciation serait donc déterminé par les cibles clivées par les caspases. Dans ce modèle de différenciation induite par les caspases, il reste à comprendre par quels mécanismes les cibles sont protégées du clivage puisque la protéine GATA-1 colocalise avec la caspase-3 activée dans le noyau.

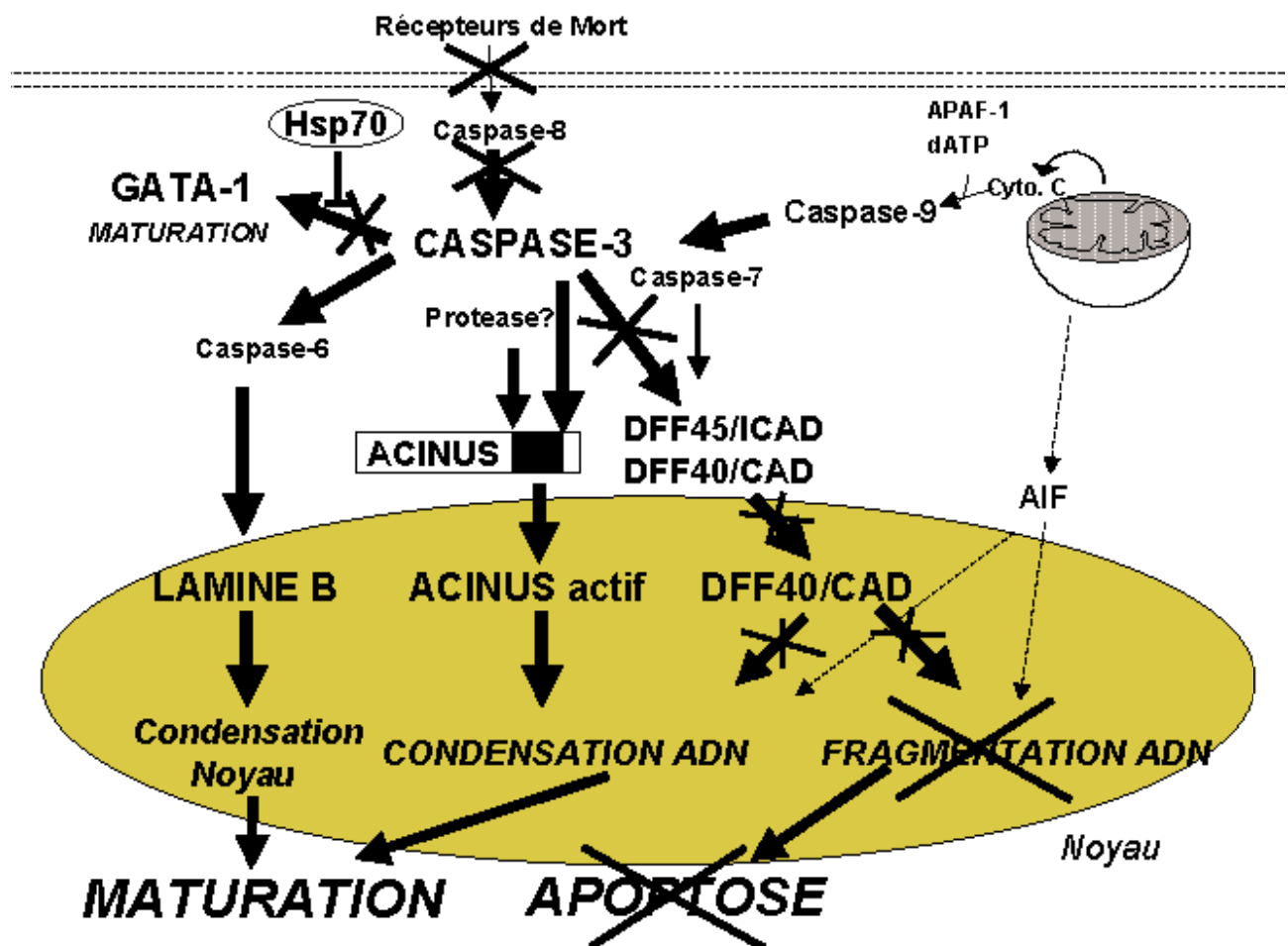


FIG. 5. – Rôle des caspases dans la maturation des érythroblastes. L'absence de clivage d'ICAD et de GATA-1 détermine le devenir de l'érythroblaste entre maturation et apoptose.

RÔLE DES CASPASES DANS LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES HEMATOPOÏÉTIQUES EN DEHORS DE L'ÉRYTHROPOÏÈSE ET DANS L'ACTIVATION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE

Le rôle des caspases dans la différenciation érythroblastique n'est pas limité à ce modèle et a été retrouvé dans d'autres processus de différenciation hématopoïétique et de régulation du système immunitaire.

Rôle des caspases dans le système immunitaire

La caspase-1 a été initialement identifiée comme la protéase responsable de la maturation d'une cytokine multifonctionnelle, l'Interleukine 1 β (IL-1 β) (Cerretti *et al.*, 1992). Il a ensuite été démontré qu'elle était également impliquée dans la maturation de l'IL-18 (Ghayur *et al.*, 1997). La caspase-3 interviendrait dans le processus de maturation de l'IL-16 des cellules T (Wu *et al.*, 1999). Les caspases sont impliquées dans l'activation lymphocytaire T et dans différentes voies de différenciation. L'activation de la caspase-3, sans apoptose, a été rapportée pour la première fois dans des lymphocytes T stimulés par la phytohémataglutinine (PHA) pendant les premières étapes de la prolifération lymphocytaire T (Miossec *et al.*, 1997). Ces résultats ont ensuite été confirmés et la participation de protéases de la famille de la caspase-3 a été mise en évidence dans l'activation lymphocytaire T après stimulation par des mitogènes et l'IL-2. Les mécanismes moléculaires d'activation des caspases dans ces systèmes restent à déterminer.

Rôle des caspases dans la différenciation des monocytes en macrophages

Une activation de la caspase-3 et de la caspase-9 est observée au cours de la différenciation des monocytes du sang circulant en macrophages en réponse au "macrophage colony-stimulating factor" (M-CSF), en l'absence d'apoptose. Cette activation des caspases n'est pas observée lors de la différenciation des monocytes en cellules dendritiques induite par l'IL-4 et le "granulocyte-macrophage colony-stimulating factor" (GM-CSF) (Sordet *et al.*, 2002). Lors de la différenciation macrophagique comme au cours de l'érythropoïèse (Zermati *et al.*, 2001), l'activation des caspases-3 et -9 est induite par la voie mitochondriale avec libération de cytochrome c mitochondrial et protéolyse d'Acinus alors qu'il semble que certains substrats tels que PARP soient protégés de l'activation des caspases (Sordet *et al.*, 2002). Cette différenciation est inhibée par un inhibiteur des caspases et par l'hyperexpression de Bcl2 (Sordet *et al.*, 2002). Les cibles et les mécanismes d'action des caspases dans ce processus restent à être élucidés.

Rôle des caspases dans la différenciation mégacaryocytaire

L'activation des caspases est également nécessaire à la différenciation mégacaryocytaire. Comme au cours de

l'érythropoïèse, les caspases jouent des rôles contrastés au cours de la mégacaryopoïèse. L'activation des caspases induite par Fas inhibe la mégacaryopoïèse. L'anticorps agoniste anti-CD95 induit un arrêt de différenciation des mégacaryocytes par activation des caspases (De Maria *et al.*, 1999). Un blocage de la différenciation est associé à la protéolyse de GATA-1 et de NF-E2 (De Maria *et al.*, 1999), deux facteurs de transcription essentiels pour la différenciation mégacaryocytaire terminale (Shivdasani *et al.*, 1995). Bien que la contribution du clivage des facteurs de transcription induit par la stimulation de CD95 dans l'arrêt de la mégacaryopoïèse reste à élucider, la déplétion de GATA-1 semble jouer un rôle majeur dans ce processus. Sur le plan phénotypique, les mégacaryocytes déficients en GATA-1 comme dans les cellules stimulées par l'anti-CD95 n'ont pas d'endomitose et leur prolifération est diminuée (De Maria *et al.*, 1999; Vyas *et al.*, 1999). Ainsi le clivage des facteurs de transcription semble un mécanisme responsable d'une régulation négative de la mégacaryopoïèse. Il a été mis initialement en évidence que, chez les souris surexprimant Bcl2 (Ogilvy *et al.*, 1999), ainsi que chez les souris invalidées pour le gène proapoptotique Bim (Bouillet *et al.*, 1999), le nombre de thrombocytes circulants est réduit de moitié alors que le nombre des mégacaryocytes médullaires reste inchangé. L'inhibition de la thrombocyto-genèse par l'hyperexpression de Bcl2 semble indiquer que la voie intrinsèque de l'activation des caspases est impliquée dans le processus de libération des thrombocytes par les mégacaryocytes (Ogilvy *et al.*, 1999). De même, l'hyperexpression du gène antiapoptotique Bcl-x_L chez des souris transgéniques montre des anomalies de la fragmentation thrombocytaire (Kaluzhny *et al.*, 2002). Il a ensuite été rapporté que, comme dans l'érythropoïèse, l'activation des caspases était impliquée dans la mégacaryocytopoïèse humaine (De Botton *et al.*, 2002). Tout d'abord, chez l'Homme comme chez les modèles murins, la surexpression de Bcl2 ainsi que l'inhibition des caspases bloquent la formation des prothrombocytes (De Botton *et al.*, 2002). Puis il a été mis en évidence que l'activation des caspases a lieu à deux étapes de la maturation mégacaryocytaire : une première étape d'activation de la voie intrinsèque, avec la libération de cytochrome c et l'activation cytoplasmique de la caspase-9 et de la caspase-3, qui a lieu avant la phase de formation des prothrombocytes et est limitée à certains compartiments cellulaires seulement. Une seconde étape d'activation diffuse des caspases a lieu à la fin du processus de maturation après la libération des thrombocytes (De Botton *et al.*, 2002). La première phase d'activation des caspases ne s'accompagne pas de la mort de la cellule, alors que la seconde vague d'activation est associée à l'apoptose du mégacaryocyte (De Botton *et al.*, 2002). Le mécanisme de formation des prothrombocytes pourraient mimer les « blebbings » observés lors de l'apoptose (Mills *et al.*, 1999). Cependant ceux-ci restent localisés à des sous-compartiments cellulaires où se produit la formation des thrombocytes. La formation des prothrombocytes est associée à des changements majeurs du cytosquelette, incluant le clivage de la gelsoline,

l'activation des microtubules (Radley & Scurfield, 1980; Cramer *et al.*, 1997; Lecine *et al.*, 2000; Tablin *et al.*, 1990), la polymérisation de l'actine et la phosphorylation de la myosine (Italiano *et al.*, 1999; Rojnuckarin & Kauschansky, 2001; Kelley *et al.*, 2000; Kunishima *et al.*, 2001). Plusieurs molécules du cytosquelette ou régulateurs de l'actine, comme la gelsoline, régulateur de la famille des Rho guanosine triphosphatases (GTPases), ou leurs effecteurs ont été décrits comme des substrats des caspases responsables lors de l'apoptose de la formation des blebbings membranaires par inhibition de la myosine phosphatase (Kimura *et al.*, 1996; Sebbagh *et al.*, 2001; Coleman *et al.*, 2001). Au cours de ces phénomènes, les facteurs de transcription GATA-1 et NF-E2 ne sont pas clivés. Contrairement à l'érythropoïèse où les caspases colocalisent avec GATA-1, cette absence de clivage pourrait être liée à une localisation différentielle des caspases au cours de la différenciation et de l'apoptose.

MISE EN ÉVIDENCE DE L'IMPLICATION DES CASPASES DANS LES PROCESSUS DE DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE EN DEHORS DE L'HEMATOPOÏÈSE

Les premières preuves d'un rôle des caspases au cours de la différenciation cellulaire proviennent des études sur les cellules du cristallin (Ishizaki *et al.*, 1998; Wride *et al.*, 1999) et les kératinocytes (Weil *et al.*, 1999). Chez les rongeurs, lorsque les cellules épithéliales du cristallin acquièrent leurs caractéristiques de différenciation terminale, un membre de la sous-famille caspase-3 est activé et est impliqué dans les modifications cytologiques morphologiques qui permettent la formation des fibres du cristallin (Ishizaki *et al.*, 1998). L'inhibition des caspases bloque l'énucléation des cellules du cristallin qui a lieu lors de la phase terminale de maturation des cellules (Ishizaki *et al.*, 1998). Ce processus est sous la dépendance du "Fibroblast Growth Factor" (FGF) nécessaire à la différenciation et à la protection de l'apoptose (Ishizaki *et al.*, 1998). Il a également été montré que les caspases sont activées par la voie mitochondriale lors de la différenciation des kératinocytes (Weil *et al.*, 1999) et que cette activation est nécessaire pour l'expulsion du noyau qui a lieu lors de la phase terminale de maturation. Récemment il a été mis en évidence que la caspase-14 est activée pendant la différenciation des kératinocytes (Chien *et al.*, 2002).

L'activation des caspases est impliquée dans les modifications morphologiques terminales de la spermatogenèse chez la Drosophile (Arama *et al.*, 2003). A noter que, chez cet insecte, les caspases sont activées uniquement dans le cytoplasme car une activation nucléaire entraîne une hypercondensation nucléaire et une stérilité (Arama *et al.*, 2003). Les caspases nucléaires sont inhibées par une protéine de la famille des IAP (Arama *et al.*, 2003). Ainsi, chez ce modèle, la régulation de l'activité des caspases serait sous la dépendance de la localisation nucléaire et/ou cytoplasmique des IAP.

De même, les modifications cellulaires observées lors de la différenciation des cellules du muscle strié ont des points communs avec les modifications morphologiques décrites lors de l'apoptose (Fernando *et al.*, 2002). Par exemple la réorganisation de l'actine est observée lors des deux phénomènes. La kinase de la chaîne légère de la myosine est une protéine du muscle contractile qui est nécessaire aux blebbings membranaires des cellules apoptotiques. Au cours de la différenciation du muscle strié, la caspase-3 est impliquée dans la myogenèse chez la Souris. La caspase-3 active une kinase (MST1) qui est impliquée dans la myogenèse qui aurait comme substrats des membres de la voie p38 MAPK (Fernando *et al.*, 2002). Ces kinases induisent la myogenèse en phosphorylant et en augmentant l'activité de facteur de transcription du muscle squelettique (Fernando *et al.*, 2002). La phase de fusion des myoblastes de rat est sous la dépendance de la diminution de l'expression de la calpastatine. La caspase-1 est indispensable à ce processus, car elle clive la calpastatine (Barnoy & Kosower, 2003). A noter que la protéine anti-apoptotique Bcl2 est exprimée dans les premières étapes de prolifération de la myogenèse, mais ne l'est plus lors de la phase de différenciation des myoblastes (Huppertz *et al.*, 2001; Dominov *et al.*, 1998). Le facteur de transcription FKHR qui induit habituellement l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose est nécessaire pour la fusion des myoblastes de souris (Bois & Grosveld, 2003).

Au cours du processus de transformation oncogénique, un arrêt d'activation «physiologique» des caspases pourrait contribuer au blocage de la différenciation. Ainsi l'étude de la différenciation des cellules de carcinome du côlon HT29 par du butyrate met en évidence d'une part que la caspase-3 et la caspase-9 sont activées et d'autre part que cette différenciation est inhibée par l'hyperexpression de Bcl-x_L (Cai *et al.*, 2004).

MÉCANISMES DE RÉSISTANCE DES CELLULES EN COURS DE DIFFÉRENCIATION À L'APOPTOSE LORS DE LA PHASE D'ACTIVATION DES CASPASES

Dans les modèles présentés ci-dessus, où les caspases jouent un rôle dans la différenciation, se pose le problème des mécanismes responsables de l'absence d'apoptose alors que les caspases sont activées. Comme nous l'avons vu, plusieurs hypothèses peuvent être émises. Le taux d'activation des caspases pourrait être différent au cours de l'apoptose et de la différenciation, et certains substrats pourraient avoir une plus forte affinité (clivage au cours de la différenciation) que d'autres (clivage au cours de l'apoptose). Cette hypothèse semble peu probable puisque, dans la plupart des modèles, les taux d'activation des caspases ne semblent pas significativement différents entre différenciation et apoptose. Par exemple, le taux d'activation des caspases retrouvé dans les lymphocytes T proliférants ou en voie d'activation, est très nettement supérieur à celui trouvé dans des cel-

lules tumorales en apoptose, suggérant l'existence d'un mécanisme antiapoptotique fort en aval de l'activation de la caspase-3 qui inhiberait une mort inappropriée et prématurée de ces cellules (Wilhelm *et al.*, 1998).

Au cours de la différenciation érythroïde terminale humaine, la caspase-3 activée colocalise avec GATA-1 dans le noyau de cellules érythroïdes, au cours de la différenciation comme lors de l'apoptose par privation en EPO (Ribeil *et al.*, 2004). Bcl-x_L est la principale protéine anti-apoptotique connue jusqu'ici pour son implication dans l'érythropoïèse, en amont de la cascade d'activation des caspases, où elle inhibe l'ouverture des pores mitochondriaux et ainsi la libération de molécules pro-apoptotiques (cytochrome c, Smac/DIABLO) de la mitochondrie vers le cytosol. Ainsi, l'expression de Bcl-x_L, dont le rôle se situe en amont de l'activation des caspases, ne peut pas expliquer la différence de protection spécifique de certains substrats des caspases entre les érythroblastes cultivés en présence d'EPO et ceux dont l'apoptose est induite par privation en EPO.

Dans certains modèles comme celui des mégacaryocytes, l'activation des caspases pourrait se situer dans différents compartiments subcellulaires et expliquer les différences entre apoptose et différenciation. Les mécanismes qui sous-tendent ces différences de localisation ne sont actuellement pas connus. Dans d'autres modèles, des inhibiteurs des caspases comme les IAP pourraient

se localiser dans différents compartiments pour bloquer de façon élective l'activation des caspases et protéger certaines cibles, par exemple comme dans le modèle de la spermatogenèse de la *Drosophile* (Arama *et al.*, 2003).

Une autre hypothèse suggère que des molécules anti-apoptotiques pourraient, en fonction de leur localisation cellulaire, agir sur la cible pour empêcher son clivage par les caspases. Ce modèle pourrait s'appliquer à l'érythropoïèse par l'intervention des protéines de choc thermique (heat shock proteins, Hsp).

Les Hsps, définies à l'origine pour leur rôle cytoprotecteur contre le choc thermique, constituent une classe de protéines très conservées dans l'évolution. Parmi les heat shock protéins, la famille Hsp70 est constituée de plusieurs membres dont la protéine Hsp70 inductible par le stress. Dans les conditions normales, les Hsp70 sont des molécules chaperonnes ATP-dépendantes impliquées dans la conformation des polypeptides nouvellement synthétisés, l'assemblage des complexes multi-protéiques et le transport protéique transmembranaire (Shi & Thomas, 1998). L'expression d'Hsp70 inductible a été observée au cours de stress, en réponse à des stimuli apoptotiques par activation de protéines kinases activées par le stress, la génération de radicaux libres, la modification du potentiel transmembranaire mitochondrial, la libération de cytochrome c de la mitochondrie et l'activation de caspases de type caspase-3 (Jaattela *et al.*, 1998). La

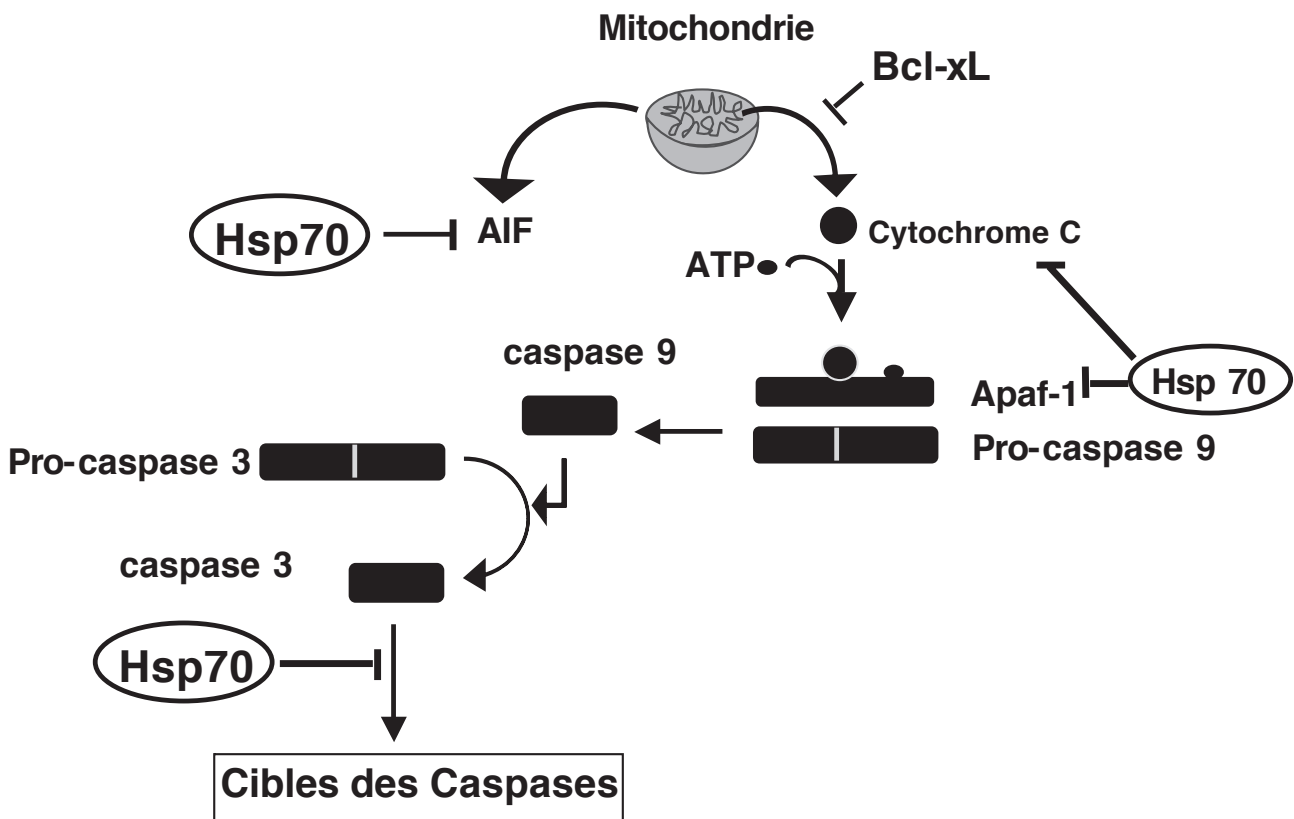


FIG. 6. – Rôle anti-apoptotique d'Hsp70.

synthèse de la protéine Hsp70 inductible augmente la capacité des cellules stressées à faire face à une concentration accrue de protéines non repliées ou dénaturées (Nollen *et al.*, 1999). L'expression d'Hsp70 inductible est augmentée dans les cellules cancéreuses de souris (Jaattela, 1995) et peut inhiber l'apoptose, augmentant ainsi le temps de survie de cellules exposées à différents stimuli létaux (Jaattela *et al.*, 1992; Mosser *et al.*, 1997). En effet, la surexpression d'Hsp70 inductible réduit ou bloque l'activation des caspases et supprime les altérations mitochondriales et les fragmentations nucléaires (Buzzard *et al.*, 1998). Hsp70 protège les cellules de l'apoptose en agissant à la fois en amont et en aval de l'activation de la cascade des caspases. Hsp70 inhibe en effet l'apoptose en aval de la mitochondrie et en amont de l'activation de la caspase-3 en s'associant aux protéines apoptotiques incluant le cytochrome c (Li *et al.*, 2000) et Apaf-1, ce qui prévient le recrutement de la pro-caspase-9 et la formation de l'apoptosome (Fig. 6). Par ailleurs, Hsp70 inhibe également l'apoptose, en amont de l'activation de la caspase-3, en s'associant à AIF (Apoptosis Inducing Factor) (Kroemer, 2001) (Fig. 6). Dans des expériences de surexpression d'Hsp70 dans la lignée ME-180 de carcinome cervical humain, l'action anti-apoptotique d'Hsp70 contre l'effet de la staurosporine peut aussi s'exercer en aval de l'activation des caspases en bloquant la fragmentation de l'ADN (Jaattela *et al.*, 1998) (Fig. 6). En effet, ces cellules sont capables de reprendre une croissance normale malgré la libération de cytochrome c et le clivage de substrats des caspases comme PARP, PKC delta et cPLA₂ (Jaattela *et al.*, 1998). Ces résultats indiquent que, dans certaines conditions, le point de non-retour dans la voie de l'apoptose se situe en aval de l'activation des caspases. Dans ce modèle, comme dans les érythroblastes en cours de maturation, la caspase-3 est activée alors que l'apoptose est inhibée. Nous avons émis l'hypothèse que la protéine Hsp70 pourrait agir en aval de la caspase-3 pour protéger les érythroblastes de l'apoptose lors de la différenciation érythroïde terminale pendant la phase d'activation des caspases. Nos résultats préliminaires suggèrent qu'au cours de la différenciation érythroblastique, GATA-1 serait ainsi protégé par Hsp70 du clivage par les caspases (Ribeil *et al.*, 2004). Nous avons mis en évidence qu'Hsp70 inductible est une protéine qui, au cours de la différenciation érythroïde terminale, par son interaction avec une de ses cibles joue un nouveau rôle antiapoptotique majeur en empêchant le clivage de GATA-1 par la caspase-3 (Fig. 5). La protéine Hsp70 est localisée dans le cytoplasme et le noyau où elle colocalise avec GATA-1 au cours de la différenciation érythroblastique. Au cours de l'apoptose induite par la privation en EPO, Hsp70 serait délocalisée du noyau vers le cytoplasme permettant ainsi le clivage de GATA-1 par la caspase-3 activée. Nous proposons donc un modèle dans lequel l'EPO détermine le destin des érythroblastes (apoptose versus différenciation) en aval de la caspase-3, en régulant la localisation d'Hsp70 (cytoplasmique versus nucléaire et cytoplasmique).

CONCLUSION

Dans cette revue, nous avons discuté le rôle des caspases dans les processus de différenciation cellulaire lors de l'hématopoïèse, en particulier à travers l'exemple de l'érythropoïèse, et dans d'autres types cellulaires en dehors de l'hématopoïèse. Ces modèles suggèrent que les caspases, des enzymes responsables de l'apoptose, sont également indispensables à de nombreux processus de différenciation. Ainsi comme souligné depuis de nombreuses années, différenciation et apoptose sont des processus proches. Le clivage de certaines cibles, et pas d'autres, par les caspases pourrait déterminer le choix du destin cellulaire entre apoptose et différenciation. Cette proximité est sans doute importante pour permettre à l'organisme de s'adapter à certaines conditions pathologiques. Par exemple au cours de l'érythropoïèse, les tissus doivent être oxygénés en permanence, mais le nombre de globules rouges ne doit pas être trop important; un certain niveau d'apoptose des érythroblastes peut rapidement faire place à la différenciation et la production de globules rouges pour répondre au stress hypoxique. Ces mécanismes de régulation fine pourraient être perturbés dans de nombreux tissus et dans de nombreuses circonstances pathologiques et pourraient ouvrir une nouvelle voie dans la compréhension de la physiopathologie de certaines proliférations tumorales et/ou de certaines pathologies dégénératives. D'un point de vue finaliste le fait que des enzymes responsables de la mort cellulaire soient impliquées dans la différenciation pourrait obéir à une certaine logique. Les erreurs dans la différenciation pourraient conduire à la mort cellulaire évitant ainsi la transmission de ces erreurs qui seraient nuisibles à l'espèce. A quoi bon d'ailleurs le blocage des caspases pour empêcher la mort de l'organisme, ce qui ne lui permettrait pas de survivre, ce blocage empêchant également sa différenciation. Cette proximité entre mort et différenciation permet la mort de l'organisme une fois qu'il s'est différencié et favorise ainsi l'évolution et la diversité de l'espèce.

BIBLIOGRAPHIE

- Arama E., Agapite J. & Steller H., Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Dev. Cell.*, 2003, 4, 687-697.
- Barnoy S. & Kosower N. S., Caspase-1-induced calpastatin degradation in myoblast differentiation and fusion: cross-talk between the caspase and calpain systems. *FEBS Lett.* 2003, 546, 213-217.
- Bois P. R. & Grosveld G. C., FKHR (FOXO1a) is required for myotube fusion of primary mouse myoblasts. *Embo J.* 2003, 22, 1147-1157.
- Bouillet P., Metcalf D., Huang D. C., Tarlinton D. M., Kay T. W., Kontgen F., *et al.*, Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science*, 1999, 286, 1735-1738.
- Brahimi-Horn C., Mazure N. & Pouyssegur J., Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple post-translational modifications. *Cell. Signal.*, 2005, 17, 1-9.

- Buzzard K. A., Giaccia A. J., Killender M. & Anderson R. L., Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 17147-17153.
- Cai J., Chen Y., Murphy T. J., Jones D. P. & Sartorelli A. C., Role of caspase activation in butyrate-induced terminal differentiation of HT29 colon carcinoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2004, 424, 119-127.
- Cantor A. B. & Orkin S. H., Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene*, 2002, 21, 3368-3376.
- Carlile G. W., Smith D. H. & Wiedmann M., Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood*, 2004, 103, 4310-4316.
- Cerretti D. P., Kozlosky C. J., Mosley B., Nelson N., Van Ness K., Greenstreet T. A. *et al.*, Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*, 1992, 256, 97-100.
- Chien A. J., Presland R. B. & Kuehle M. K., Processing of native caspase-14 occurs at an atypical cleavage site in normal epidermal differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 296, 911-917.
- Coleman M. L., Sahai E. A., Yeo M., Bosch M., Dewar A. & Olson M. F., Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.*, 2001, 3, 339-345.
- Cramer E. M., Norol F., Guichard J., Breton-Gorius J., Vainchenker W., Masse J. M. *et al.*, Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand. *Blood*, 1997, 89, 2336-2346.
- De Botton S., Sabri S., Daugas E., Zermati Y., Guidotti J. E., Hermine O. *et al.*, Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*, 2002, 100, 1310-1317.
- De Maria R., Testa U., Luchetti L., Zeuner A., Stassi G., Pelosi E. *et al.*, Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood*, 1999, 93, 796-803.
- De Maria R., Zeuner A., Eramo A., Domenichelli C., Bonci D., Grignani F. *et al.*, Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*, 1999, 401, 489-493.
- Dominov J. A., Dunn J. J. & Miller J. B., Bcl-2 expression identifies an early stage of myogenesis and promotes clonal expansion of muscle cells. *J. Cell. Biol.*, 1998, 142, 537-544.
- Fernando P., Kelly J. F., Balazsi K., Slack R. S. & Megeney L. A., Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 11025-11030.
- Ghayur T., Banerjee S., Hugunin M., Butler D., Herzog L., Carter A. *et al.*, Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature*, 1997, 386, 619-623.
- Gregoli P. A. & Bondurant M. C., Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythroid progenitors. *J. Cell. Physiol.*, 1999, 178, 133-143.
- Gregory C. J. & Eaves A. C., Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood*, 1978, 51, 527-537.
- Huppertz B., Tews D. S. & Kaufmann P., Apoptosis and syncytial fusion in human placental trophoblast and skeletal muscle. *Int. Rev. Cytol.*, 2001, 205, 215-253.
- Ishizaki Y., Jacobson M. D. & Raff M. C., A role for caspases in lens fiber differentiation. *J. Cell. Biol.*, 1998, 140, 153-158.
- Italiano J. E Jr., Lecine P., Shivdasani R. A. & Hartwig J. H., Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J. Cell. Biol.*, 1999, 147, 1299-1312.
- Jaattela M., Wissing D., Bauer P. A. & Li G. C., Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *Embo J.*, 1992, 11, 3507-3512.
- Jaattela M., Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *Int. J. Cancer*, 1995, 60, 689-693.
- Jaattela M., Wissing D., Kokholm K., Kallunki T. & Egeblad M., Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *Embo J.*, 1998, 17, 6124-6134.
- Kaluzhny Y., Yu G., Sun S., Toselli P. A., Nieswandt B., Jackson C. W. *et al.*, BclxL overexpression in megakaryocytes leads to impaired platelet fragmentation. *Blood*, 2002, 100, 1670-1678.
- Kelley M. J., Jawien W., Ortel T. L. & Korczak J. F., Mutation of MYH9, encoding non-muscle myosin heavy chain A, in May-Hegglin anomaly. *Nat. Genet.* 2000, 26, 106-108.
- Kimura K., Ito M., Amano M., Chihara K., Fukata Y., Nakafuku M. *et al.*, Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, 1996, 273, 245-248.
- Kolbus A., Pilat S., Husak Z., Deiner E. M., Stengl G., Beug H. *et al.*, Raf-1 antagonizes erythroid differentiation by restraining caspase activation. *J. Exp. Med.*, 2002, 196, 1347-1353.
- Koury M. J. & Bondurant M. C., Control of red cell production: the roles of programmed cell death (apoptosis) and erythropoietin. *Transfusion*, 1990, 30, 673-674.
- Koury M. J., Sawyer S. T. & Brandt S. J., New insights into erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol.*, 2002, 9, 93-100.
- Kroemer G., Dallaporta B. & Resche-Rigon M., The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.*, 1998, 60, 619-642.
- Kroemer G., Heat shock protein 70 neutralizes apoptosis-inducing factor. *ScientificWorld Journal*, 2001, 1, 590-592.
- Kunishima S., Kojima T., Matsushita T., Tanaka T., Tsurusawa M., Furukawa Y. *et al.*, Mutations in the NMMHC-A gene cause autosomal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions (May-Hegglin anomaly/Sebastian syndrome). *Blood*, 2001, 97, 1147-1149.
- Lecine P., Italiano J. E. Jr., Kim S. W., Villeval J. L. & Shivdasani R. A., Hematopoietic-specific beta 1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2. *Blood*, 2000, 96, 1366-1373.
- Li C. Y., Lee J. S., Ko Y. G., Kim J. I. & Seo J. S., Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 25665-25671.
- Mills J. C., Stone N. L. & Pittman R. N., Extranuclear apoptosis. The role of the cytoplasm in the execution phase. *J. Cell Biol.*, 1999, 146, 703-708.
- Miossec C., Dutilleul V., Fassy F. & Diu-Hercend A., Evidence for CPP32 activation in the absence of apoptosis during T lymphocyte stimulation. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 13459-13462.
- Mosser D. D., Caron A. W., Bourget L., Denis-Larose C. & Massie B., Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 1997, 17, 5317-5327.
- Nollen E. A., Brunsting J. F., Roelofsen H., Weber L. A. & Kampinga H. H., *In vivo* chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol. Cell Biol.*, 1999, 19, 2069-2079.
- Ogilvy S., Metcalf D., Print C. G., Bath M. L., Harris A. W. & Adams J. M., Constitutive Bcl-2 expression throughout the hematopoietic compartment affects multiple lineages and enhances progenitor cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 14943-14948.
- Peller S., Frenkel J., Lapidot T., Kahn J., Rahimi-Levene N., Yona R. *et al.*, The onset of p53-dependent apoptosis plays a role in terminal differentiation of human normoblasts. *Oncogene*, 2003, 22, 4648-4655.
- Radley J. M. & Scurfield G., The mechanism of platelet release. *Blood*, 1980, 56, 996-999.
- Ribeil J. A., Zermati Y., Kersual J., Dussiot M., Audat F., Pouzet C., Valensi F., Varet B., Solary E., Garrido C. & Hermine O., Hsp70 is a new major regulator of erythropoiesis

- by preventing caspase-3 mediated cleavage of GATA-1. *American Society of Hematology*, 2004 Dec. 4-7 San Diego, *Blood* 2004, 104, 168.
- Rojnuckarin P. & Kaushansky K., Actin reorganization and proplatelet formation in murine megakaryocytes: the role of protein kinase calpha. *Blood*, 2001, 97, 154-161.
- Sebbagh M., Renvoize C., Hamelin J., Riche N., Bertoglio J. & Breard J., Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat. Cell. Biol.*, 2001, 3, 346-352.
- Shi Y. & Thomas J. O., The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol. Cell. Biol.*, 1992, 12, 2186-2192.
- Shivdasani R. A., Rosenblatt M. F., Zucker-Franklin D., Jackson C. W., Hunt P., Saris C. J. *et al.*, Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell*, 1995, 81, 695-704.
- Sordet O., Rebe C., Plenchette S., Zermati Y., Hermine O., Vainchenker W. *et al.*, Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood*, 2002, 100, 4446-4453.
- Tablin F., Castro M. & Leven R. M., Blood platelet formation *in vitro*. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J. Cell. Sci.*, 1990, 97, 59-70.
- Vyas P., Ault K., Jackson C. W., Orkin S. H. & Shivdasani R. A., Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood*, 1999, 93, 2867-2875.
- Weil M., Raff M. C. & Braga V. M., Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr. Biol.*, 1999, 9, 361-364.
- Wilhelm S., Wagner H. & Hacker G., Activation of caspase-3-like enzymes in non-apoptotic T cells. *Eur. J. Immunol.* 1998, 28, 891-900.
- Wride M. A., Parker E. & Sanders E. J., Members of the bcl-2 and caspase families regulate nuclear degeneration during chick lens fibre differentiation. *Dev. Biol.*, 1999, 213, 142-156.
- Wu D. M., Zhang Y., Parada N. A., Kornfeld H., Nicoll J., Center D. M. *et al.*, Processing and release of IL-16 from CD4⁺ but not CD8⁺ T cells is activation dependent. *J. Immunol.*, 1999, 162, 1287-1293.
- Zermati Y., Garrido C., Amsellem S., Fishelson S., Bouscary D., Valensi F. *et al.*, Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J. Exp. Med.*, 2001, 193, 247-254.

ANNEXE II

Communications à des Congrès Internationaux

COMMUNICATION ORALE

Jean-Antoine Ribeil¹, Yael Zermati¹, Joelle Kersual¹, Michael Dussiot¹, Francoise Audat¹, Cecile Pouzet², Francoise Valensi¹, Bruno Varet¹, Eric Solary³, Carmen Garrido³ and Olivier Hermine¹

¹ CNRS UMR 8147 and Dpt of Hematology, NECKER, Paris, France; ² IFR02, Bichat, Paris, France and ³ INSERM U517, Faculté de Pharmacie, Dijon, France.

Abstract

Red blood cell production depends on apoptosis rate of erythroid progenitors and precursors. This process is mainly regulated by the glycoprotein Erythropoietin, which positively regulates through the JAK/STAT5 pathway, in synergy with the transcription factor GATA-1, the expression of the antiapoptotic protein Bcl-X_L. Thus, Erythropoietin starvation results in caspase-3 activation through the intrinsic mitochondrial pathway, and as a consequence GATA-1 is cleaved and apoptosis occurs. Recently we have shown that caspase-3 activation is also absolutely required for the morphological changes that occur during normal human terminal erythroid differentiation, including chromatin condensation as well as nucleus and cell size reduction. In this context, although activated caspase-3 colocalizes in the nucleus with GATA-1, apoptosis and GATA-1 cleavage do not occur (Zermati et al, 2001). Heat Shock Proteins (Hsp) are chaperons that play a major role as a modulator of apoptosis. Here, we report by western blot and confocal analysis that inducible Hsp70 is constitutively expressed during human terminal erythroid differentiation, in both nuclear and cytoplasmic erythroblast compartments. Hsp70 co-localizes and co-immunoprecipitates with GATA-1 in the nucleus at the onset of caspases activation during terminal erythroid differentiation. Rapidly (<6h) after Erythropoietin starvation, while Hsp70 nuclear localization is lost, GATA-1 is cleaved. In contrast, in the presence of the nuclear export inhibitor Leptomycin B, Hsp70 remains in the nucleus and GATA-1 is not cleaved. In order to demonstrate the direct role of Hsp70 in GATA-1 protection, in an in vitro assay, we have shown that in a dose dependant manner recombinant Hsp70, but not Hsp90, inhibits recombinant caspase-3-mediated proteolysis of GATA-1. In human erythroid CD36⁺GPA⁺ progenitors, transfection of siRNA Hsp70, but not of a scramble siRNA, reduces significantly (80% vs 0% of inhibition) Hsp 70 nuclear and cytoplasmic expression, and is associated with GATA-1 cleavage at the onset of caspase-3 activation occurring during erythroid differentiation. Hsp70 inhibition leads to significant decrease of GATA-1 regulated genes expression (hemoglobinization (8% vs 50% of benzidine positive cells) ; Bcl-X_L expression (80% inhibition) and apoptosis (8% vs 40% trypan blue positive cells). Interestingly, only mature cells are affected by siRNA Hsp70 and exhibit apoptotic features as assessed by topro3 stain and nuclear fragmentation (acidophils (90%) vs basophilic erythroblasts (10%)). Therefore, Hsp70 exerts a new critical antiapoptotic role during terminal erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. We propose a model in which, Erythropoietin determines the fate of erythroblasts (apoptosis vs differentiation) downstream of caspase-3 activation by regulating the localization of Hsp70 (cytoplasmic vs nuclear and cytoplasmic).

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Aballay, A., and Ausubel, F.M. (2001). Programmed cell death mediated by ced-3 and ced-4 protects *Caenorhabditis elegans* from *Salmonella typhimurium*-mediated killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 2735-2739.
- Abraham, M.C., and Shaham, S. (2004). Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol* *14*, 184-193.
- Acs, G., Acs, P., Beckwith, S.M., Pitts, R.L., Clements, E., Wong, K., and Verma, A. (2001). Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res* *61*, 3561-3565.
- Acs, G., Xu, X., Chu, C., Acs, P., and Verma, A. (2004). Prognostic significance of erythropoietin expression in human endometrial carcinoma. *Cancer* *100*, 2376-2386.
- Acs, G., Zhang, P.J., McGrath, C.M., Acs, P., McBroom, J., Mohyeldin, A., Liu, S., Lu, H., and Verma, A. (2003). Hypoxia-inducible erythropoietin signaling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression. *Am J Pathol* *162*, 1789-1806.
- Acs, G., Zhang, P.J., Rebbeck, T.R., Acs, P., and Verma, A. (2002). Immunohistochemical expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in breast carcinoma. *Cancer* *95*, 969-981.
- Adams, J.M., and Cory, S. (2007). Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* *19*, 488-496.
- Agashe, V.R., and Hartl, F.U. (2000). Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin Cell Dev Biol* *11*, 15-25.
- Akahane, K., Hosoi, T., Urabe, A., Kawakami, M., and Takaku, F. (1987a). Effects of recombinant human tumor necrosis factor (rhTNF) on normal human and mouse hemopoietic progenitor cells. *Int J Cell Cloning* *5*, 16-26.
- Akahane, K., Tojo, A., Tobe, K., Kasuga, M., Urabe, A., and Takaku, F. (1987b). Binding properties and proliferative potency of insulin-like growth factor I in fetal mouse liver cells. *Exp Hematol* *15*, 1068-1073.
- Alexander, W.S., Starr, R., Fenner, J.E., Scott, C.L., Handman, E., Sprigg, N.S., Corbin, J.E., Cornish, A.L., Darwiche, R., Owczarek, C.M., *et al.* (1999). SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell* *98*, 597-608.
- Allan, L.A., and Clarke, P.R. (2007). Phosphorylation of caspase-9 by CDK1/cyclin B1 protects mitotic cells against apoptosis. *Mol Cell* *26*, 301-310.
- Allan, L.A., Morrice, N., Brady, S., Magee, G., Pathak, S., and Clarke, P.R. (2003). Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nat Cell Biol* *5*, 647-654.
- Allen, T.D., and Dexter, T.M. (1982). Ultrastructural aspects of erythropoietic differentiation in long-term bone marrow culture. *Differentiation* *21*, 86-94.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* *87*, 171.
- Altnauer, F., Martinelli, S., Yousefi, S., Thurig, C., Schmid, I., Conway, E.M., Schoni, M.H., Vogt, P., Mueller, C., Fey, M.F., *et al.* (2004). Inflammation-associated cell cycle-independent block of apoptosis by survivin in terminally differentiated neutrophils. *J Exp Med* *199*, 1343-1354.

Amin, J., Ananthan, J., and Voellmy, R. (1988). Key features of heat shock regulatory elements. *Mol Cell Biol* 8, 3761-3769.

Ananthan, J., Goldberg, A.L., and Voellmy, R. (1986). Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* 232, 522-524.

Andrews, N.C., Erdjument-Bromage, H., Davidson, M.B., Tempst, P., and Orkin, S.H. (1993). Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature* 362, 722-728.

Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-230.

Ang, S.O., Chen, H., Hirota, K., Gordeuk, V.R., Jelinek, J., Guan, Y., Liu, E., Sergueeva, A.I., Miasnikova, G.Y., Mole, D., *et al.* (2002). Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. *Nat Genet* 32, 614-621.

Anguita, E., Hughes, J., Heyworth, C., Blobel, G.A., Wood, W.G., and Higgs, D.R. (2004). Globin gene activation during haemopoiesis is driven by protein complexes nucleated by GATA-1 and GATA-2. *Embo J* 23, 2841-2852.

Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., and Martinou, J.C. (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 345 Pt 2, 271-278.

Arama, E., Agapite, J., and Steller, H. (2003). Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Dev Cell* 4, 687-697.

Arany, Z., Huang, L.E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M.A., Bunn, H.F., and Livingston, D.M. (1996). An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12969-12973.

Arcasoy, M.O., Amin, K., Karayal, A.F., Chou, S.C., Raleigh, J.A., Varia, M.A., and Haroon, Z.A. (2002). Functional significance of erythropoietin receptor expression in breast cancer. *Lab Invest* 82, 911-918.

Arcasoy, M.O., and Jiang, X. (2005). Co-operative signalling mechanisms required for erythroid precursor expansion in response to erythropoietin and stem cell factor. *Br J Haematol* 130, 121-129.

Arese, P., Turrini, F., and Schwarzer, E. (2005). Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 16, 133-146.

Armstrong, J.A., Bieker, J.J., and Emerson, B.M. (1998). A SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, E-RC1, is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLF in vitro. *Cell* 95, 93-104.

Arrigo, A.P., Tanaka, K., Goldberg, A.L., and Welch, W.J. (1988). Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* 331, 192-194.

Arya, R., Mallik, M., and Lakhotia, S.C. (2007). Heat shock genes - integrating cell survival and death. *J Biosci* 32, 595-610.

Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.

Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A.E., Hebert, A., *et al.* (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104, 155-162.

Baehrecke, E.H. (2002). How death shapes life during development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 779-787.

Baler, R., Dahl, G., and Voellmy, R. (1993). Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1. *Mol Cell Biol* 13, 2486-2496.

Baliga, B.C., Read, S.H., and Kumar, S. (2004). The biochemical mechanism of caspase-2 activation. *Cell Death Differ* 11, 1234-1241.

Banerji, S.S., Laing, K., and Morimoto, R.I. (1987). Erythroid lineage-specific expression and inducibility of the major heat shock protein HSP70 during avian embryogenesis. *Genes Dev* 1, 946-953.

Banerji, S.S., Theodorakis, N.G., and Morimoto, R.I. (1984). Heat shock-induced translational control of HSP70 and globin synthesis in chicken reticulocytes. *Mol Cell Biol* 4, 2437-2448.

Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641-643.

Barchetta, S., La Terza, A., Ballarini, P., Pucciarelli, S., and Miceli, C. (2008). Combination of two regulatory elements in the *Tetrahymena thermophila* HSP70-1 gene controls heat shock activation. *Eukaryot Cell* 7, 379-386.

Bardwell, J.C., and Craig, E.A. (1984). Major heat shock gene of *Drosophila* and the *Escherichia coli* heat-inducible *dnaK* gene are homologous. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 848-852.

Barkla, D.H., and Gibson, P.R. (1999). The fate of epithelial cells in the human large intestine. *Pathology* 31, 230-238.

Barnoy, S., and Kosower, N.S. (2003). Caspase-1-induced calpastatin degradation in myoblast differentiation and fusion: cross-talk between the caspase and calpain systems. *FEBS Lett* 546, 213-217.

Barroga, C.F., Pham, H., and Kaushansky, K. (2008). Thrombopoietin regulates c-Myb expression by modulating micro RNA 150 expression. *Exp Hematol* 36, 1585-1592.

Barry, M., and Bleackley, R.C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2, 401-409.

Bartunek, P., Kralova, J., Blendinger, G., Dvorak, M., and Zenke, M. (2003). GATA-1 and c-myb crosstalk during red blood cell differentiation through GATA-1 binding sites in the c-myb promoter. *Oncogene* 22, 1927-1935.

Batra, S., Perelman, N., Luck, L.R., Shimada, H., and Malik, P. (2003). Pediatric tumor cells express erythropoietin and a functional erythropoietin receptor that promotes angiogenesis and tumor cell survival. *Lab Invest* 83, 1477-1487.

Bauer, A., Mikulits, W., Lager, G., Stengl, G., Brosch, G., and Beug, H. (1998). The thyroid hormone receptor functions as a ligand-operated developmental switch between proliferation and differentiation of erythroid progenitors. *Embo J* 17, 4291-4303.

Bauer, A., Tronche, F., Wessely, O., Kellendonk, C., Reichardt, H.M., Steinlein, P., Schutz, G., and Beug, H. (1999). The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes Dev* 13, 2996-3002.

Baxter, E.J., Scott, L.M., Campbell, P.J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., Vassiliou, G.S., Bench, A.J., Boyd, E.M., Curtin, N., *et al.* (2005). Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365, 1054-1061.

Beato, M., Herrlich, P., and Schutz, G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83, 851-857.

Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Tailor, P., Morimoto, R.I., Cohen, G.M., and Green, D.R. (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2, 469-475.

Begley, C.G., Aplan, P.D., Davey, M.P., Nakahara, K., Tchorz, K., Kurtzberg, J., Hershfield, M.S., Haynes, B.F., Cohen, D.I., Waldmann, T.A., *et al.* (1989a). Chromosomal translocation in

a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor delta-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2031-2035.

Begley, C.G., Aplan, P.D., Denning, S.M., Haynes, B.F., Waldmann, T.A., and Kirsch, I.R. (1989b). The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 10128-10132.

Beisner, D.R., Ch'en, I.L., Kolla, R.V., Hoffmann, A., and Hedrick, S.M. (2005). Cutting edge: innate immunity conferred by B cells is regulated by caspase-8. *J Immunol* 175, 3469-3473.

Belaaloui, G., Imbert, A.M., Bardin, F., Tonnelles, C., Dubreuil, P., Lopez, M., and Chabannon, C. (2003). Functional characterization of human CD34+ cells that express low or high levels of the membrane antigen CD111 (nectin 1). *Leukemia* 17, 1137-1145.

Bell, B.D., Leverrier, S., Weist, B.M., Newton, R.H., Arechiga, A.F., Luhers, K.A., Morrisette, N.S., and Walsh, C.M. (2008). FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16677-16682.

Beresford, P.J., Xia, Z., Greenberg, A.H., and Lieberman, J. (1999). Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity* 10, 585-594.

Berg, C.P., Engels, I.H., Rothbart, A., Lauber, K., Renz, A., Schlosser, S.F., Schulze-Osthoff, K., and Wesselborg, S. (2001). Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ* 8, 1197-1206.

Birkmann, J., Oez, S., Smetak, M., Kaiser, G., Kappauf, H., and Gallmeier, W.M. (1997). Effects of recombinant human thrombopoietin alone and in combination with erythropoietin and early-acting cytokines on human mobilized purified CD34+ progenitor cells cultured in serum-depleted medium. *Stem Cells* 15, 18-32.

Birnbaum, M.J., Clem, R.J., and Miller, L.K. (1994). An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol* 68, 2521-2528.

Black, S., Kadyrov, M., Kaufmann, P., Ugele, B., Emans, N., and Huppertz, B. (2004). Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death Differ* 11, 90-98.

Blobel, G.A., Nakajima, T., Eckner, R., Montminy, M., and Orkin, S.H. (1998). CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2061-2066.

Blomgren, K., Zhu, C., Wang, X., Karlsson, J.O., Leverin, A.L., Bahr, B.A., Mallard, C., and Hagberg, H. (2001). Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem* 276, 10191-10198.

Boer, A.K., Drayer, A.L., and Vellenga, E. (2003). Stem cell factor enhances erythropoietin-mediated transactivation of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) via the PKA/CREB pathway. *Exp Hematol* 31, 512-520.

Bogdanovic, A.D., Trpinac, D.P., Jankovic, G.M., Bumbasirevic, V.Z., Obradovic, M., and Colovic, M.D. (1997). Incidence and role of apoptosis in myelodysplastic syndrome: morphological and ultrastructural assessment. *Leukemia* 11, 656-659.

Bois, P.R., and Grosveld, G.C. (2003). FKHR (FOXO1a) is required for myotube fusion of primary mouse myoblasts. *Embo J* 22, 1147-1157.

Bokemeyer, C., and Foubert, J. (2004). Anemia impact and management: focus on patient needs and the use of erythropoietic agents. *Semin Oncol* 31, 4-11.

Bonnesen, B., Orskov, C., Rasmussen, S., Holst, P.J., Christensen, J.P., Eriksen, K.W., Qvortrup, K., Odum, N., and Labuda, T. (2005). MEK kinase 1 activity is required for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Blood* 106, 3396-3404.

Bonzon, C., Bouchier-Hayes, L., Pagliari, L.J., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2006). Caspase-2-induced apoptosis requires bid cleavage: a physiological role for bid in heat shock-induced death. *Mol Biol Cell* 17, 2150-2157.

Bortner, C.D., Oldenburg, N.B., and Cidlowski, J.A. (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 5, 21-26.

Bosman, G.J., Willekens, F.L., and Werre, J.M. (2005). Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? *Cell Physiol Biochem* 16, 1-8.

Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D.C., Tarlinton, D.M., Kay, T.W., Kontgen, F., Adams, J.M., and Strasser, A. (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286, 1735-1738.

Bouilloux, F., Juban, G., Cohet, N., Buet, D., Guyot, B., Vainchenker, W., Louache, F., and Morle, F. (2008). EKLF restricts megakaryocytic differentiation at the benefit of erythrocytic differentiation. *Blood* 112, 576-584.

Boyce, M., Degtrev, A., and Yuan, J. (2004). Caspases: an ancient cellular sword of Damocles. *Cell Death Differ* 11, 29-37.

Boyes, J., Byfield, P., Nakatani, Y., and Ogryzko, V. (1998). Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* 396, 594-598.

Brancolini, C., Sgorbissa, A., and Schneider, C. (1998). Proteolytic processing of the adherens junctions components beta-catenin and gamma-catenin/plakoglobin during apoptosis. *Cell Death Differ* 5, 1042-1050.

Brand, M., Ranish, J.A., Kummer, N.T., Hamilton, J., Igarashi, K., Francastel, C., Chi, T.H., Crabtree, G.R., Aebersold, R., and Groudine, M. (2004). Dynamic changes in transcription factor complexes during erythroid differentiation revealed by quantitative proteomics. *Nat Struct Mol Biol* 11, 73-80.

Bratosin, D., Estaquier, J., Petit, F., Arnoult, D., Quatannens, B., Tissier, J.P., Slomianny, C., Sartiaux, C., Alonso, C., Huart, J.J., *et al.* (2001). Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ* 8, 1143-1156.

Bratton, D.L., Fadok, V.A., Richter, D.A., Kailey, J.M., Guthrie, L.A., and Henson, P.M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 272, 26159-26165.

Brazil, D.P., Park, J., and Hemmings, B.A. (2002). PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell* 111, 293-303.

Brehmer, D., Rudiger, S., Gassler, C.S., Klostermeier, D., Packschies, L., Reinstein, J., Mayer, M.P., and Bukau, B. (2001). Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat Struct Biol* 8, 427-432.

Bresnick, E.H., Martowicz, M.L., Pal, S., and Johnson, K.D. (2005). Developmental control via GATA factor interplay at chromatin domains. *J Cell Physiol* 205, 1-9.

Brines, M.L., Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., de Lanerolle, N.C., Cerami, C., Itri, L.M., and Cerami, A. (2000). Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10526-10531.

Brocchieri, L., Conway de Macario, E., and Macario, A.J. (2008). hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evol Biol* 8, 19.

Broudy, V.C. (1997). Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 90, 1345-1364.

Bruey, J.M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S.A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A.P., Kroemer, G., Solary, E., *et al.* (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2, 645-652.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.

Brunner, T., Wasem, C., Torgler, R., Cima, I., Jakob, S., and Corazza, N. (2003). Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin Immunol* 15, 167-176.

Bukau, B., and Horwich, A.L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.

Butt, A.J., Harvey, N.L., Parasivam, G., and Kumar, S. (1998). Dimerization and autoprocessing of the Nedd2 (caspase-2) precursor requires both the prodomain and the carboxyl-terminal regions. *J Biol Chem* 273, 6763-6768.

Cai, J., Chen, Y., Murphy, T.J., Jones, D.P., and Sartorelli, A.C. (2004). Role of caspase activation in butyrate-induced terminal differentiation of HT29 colon carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys* 424, 119-127.

Cai, J., Yang, J., and Jones, D.P. (1998). Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 1366, 139-149.

Calderwood, S.K., and Ciocca, D.R. (2008). Heat shock proteins: stress proteins with Janus-like properties in cancer. *Int J Hyperthermia* 24, 31-39.

Calligaris, R., Bottardi, S., Cogoi, S., Apezteguia, I., and Santoro, C. (1995). Alternative translation initiation site usage results in two functionally distinct forms of the GATA-1 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11598-11602.

Calvillo, L., Latini, R., Kajstura, J., Leri, A., Anversa, P., Ghezzi, P., Salio, M., Cerami, A., and Brines, M. (2003). Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4802-4806.

Campioni, D., Secchiero, P., Corallini, F., Melloni, E., Capitani, S., Lanza, F., and Zauli, G. (2005). Evidence for a role of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in the anemia of myelodysplastic syndromes. *Am J Pathol* 166, 557-563.

Cande, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N., and Kroemer, G. (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* 84, 215-222.

Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.

Carlile, G.W., Smith, D.H., and Wiedmann, M. (2004). Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood* 103, 4310-4316.

Caro, J., Brown, S., Miller, O., Murray, T., and Erslev, A.J. (1979). Erythropoietin levels in uremic nephric and anephric patients. *J Lab Clin Med* 93, 449-458.

Carrello, A., Allan, R.K., Morgan, S.L., Owen, B.A., Mok, D., Ward, B.K., Minchin, R.F., Toft, D.O., and Ratajczak, T. (2004). Interaction of the Hsp90 cochaperone cyclophilin 40 with Hsc70. *Cell Stress Chaperones* 9, 167-181.

Casadevall, N., Vainchenker, W., Lacombe, C., Vinci, G., Chapman, J., Breton-Gorius, J., and Varet, B. (1982). Erythroid progenitors in polycythemia vera: demonstration of their hypersensitivity to erythropoietin using serum free cultures. *Blood* 59, 447-451.

Cathelin, S., Rebe, C., Haddaoui, L., Simioni, N., Verdier, F., Fontenay, M., Launay, S., Mayeux, P., and Solary, E. (2006). Identification of proteins cleaved downstream of caspase activation in monocytes undergoing macrophage differentiation. *J Biol Chem* 281, 17779-17788.

Cecconi, F., and Levine, B. (2008). The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death. *Dev Cell* 15, 344-357.

Centis, F., Tabellini, L., Lucarelli, G., Buffi, O., Tonucci, P., Persini, B., Annibali, M., Emiliani, R., Iliescu, A., Rapa, S., *et al.* (2000). The importance of erythroid expansion in determining the extent of apoptosis in erythroid precursors in patients with beta-thalassemia major. *Blood* 96, 3624-3629.

Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A., March, C.J., Kronheim, S.R., Druck, T., Cannizzaro, L.A., *et al.* (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256, 97-100.

Ch'en, I.L., Beisner, D.R., Degterev, A., Lynch, C., Yuan, J., Hoffmann, A., and Hedrick, S.M. (2008). Antigen-mediated T cell expansion regulated by parallel pathways of death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17463-17468.

Chabot, B., Stephenson, D.A., Chapman, V.M., Besmer, P., and Bernstein, A. (1988). The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 335, 88-89.

Chang, D.W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B.C., Yaish-Ohad, S., Peter, M.E., and Yang, X. (2002). c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *Embo J* 21, 3704-3714.

Chasis, J.A., and Mohandas, N. (2008). Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood* 112, 470-478.

Chen, J.J. (2007). Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2alpha kinase: relevance to anemias. *Blood* 109, 2693-2699.

Chen, M., Sandoval, H., and Wang, J. (2008). Selective mitochondrial autophagy during erythroid maturation. *Autophagy* 4, 926-928.

Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K., and Hardwick, J.M. (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278, 1966-1968.

Cheng, E.H., Levine, B., Boise, L.H., Thompson, C.B., and Hardwick, J.M. (1996). Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* 379, 554-556.

Cheung, J.Y., and Miller, B.A. (2001). Molecular mechanisms of erythropoietin signaling. *Nephron* 87, 215-222.

Chicheportiche, Y., Bourdon, P.R., Xu, H., Hsu, Y.M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I., and Browning, J.L. (1997). TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* 272, 32401-32410.

Chida, D., Miura, O., Yoshimura, A., and Miyajima, A. (1999). Role of cytokine signaling molecules in erythroid differentiation of mouse fetal liver hematopoietic cells: functional analysis of signaling molecules by retrovirus-mediated expression. *Blood* 93, 1567-1578.

Chien, A.J., Presland, R.B., and Kuechle, M.K. (2002). Processing of native caspase-14 occurs at an atypical cleavage site in normal epidermal differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 911-917.

Chin, H., Arai, A., Wakao, H., Kamiyama, R., Miyasaka, N., and Miura, O. (1998). Lyn physically associates with the erythropoietin receptor and may play a role in activation of the Stat5 pathway. *Blood* 91, 3734-3745.

Chinnaiyan, A.M. (1999). The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1, 5-15.

Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2005). Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 268-275.

Chowdhury, I., Tharakan, B., and Bhat, G.K. (2008). Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 151, 10-27.

Chu, X., Tong, Q., Cheung, J.Y., Wozney, J., Conrad, K., Mazack, V., Zhang, W., Stahl, R., Barber, D.L., and Miller, B.A. (2004). Interaction of TRPC2 and TRPC6 in erythropoietin modulation of calcium influx. *J Biol Chem* 279, 10514-10522.

Chun, H.J., Zheng, L., Ahmad, M., Wang, J., Speirs, C.K., Siegel, R.M., Dale, J.K., Puck, J., Davis, J., Hall, C.G., *et al.* (2002). Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 419, 395-399.

Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Bottger, A., and David, C.N. (1999). Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr Biol* 9, 959-962.

Clarke, A.R., Maandag, E.R., van Roon, M., van der Lugt, N.M., van der Valk, M., Hooper, M.L., Berns, A., and te Riele, H. (1992). Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* 359, 328-330.

Clarke, P.G., Posada, A., Primi, M.P., and Castagne, V. (1998). Neuronal death in the central nervous system during development. *Biomed Pharmacother* 52, 356-362.

Claustres, M., and Sultan, C. (1988). Androgen and erythropoiesis: evidence for an androgen receptor in erythroblasts from human bone marrow cultures. *Horm Res* 29, 17-22.

Clem, R.J., Cheng, E.H., Karp, C.L., Kirsch, D.G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M.B., Griffin, D.E., Earnshaw, W.C., Veluona, M.A., *et al.* (1998). Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 554-559.

Clos, J., Westwood, J.T., Becker, P.B., Wilson, S., Lambert, K., and Wu, C. (1990). Molecular cloning and expression of a hexameric Drosophila heat shock factor subject to negative regulation. *Cell* 63, 1085-1097.

Cole, J., Ertoy, D., Lin, H., Sutliff, R.L., Ezan, E., Guyene, T.T., Capecchi, M., Corvol, P., and Bernstein, K.E. (2000). Lack of angiotensin II-facilitated erythropoiesis causes anemia in angiotensin-converting enzyme-deficient mice. *J Clin Invest* 106, 1391-1398.

Conlon, P.J., Smith, S.R., Butterly, D.W., and Brennan, D.C. (1996). Losartan in post-transplant erythrocytosis. *Nephrol Dial Transplant* 11, 2524-2525.

Constantinescu, S.N., Ghaffari, S., and Lodish, H.F. (1999). The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction. *Trends Endocrinol Metab* 10, 18-23.

Constantinescu, S.N., Keren, T., Socolovsky, M., Nam, H., Henis, Y.I., and Lodish, H.F. (2001). Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4379-4384.

Correa, P.N., and Axelrad, A.A. (1991). Production of erythropoietic bursts by progenitor cells from adult human peripheral blood in an improved serum-free medium: role of insulinlike growth factor 1. *Blood* 78, 2823-2833.

Cory, S., and Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.

Cory, S., Huang, D.C., and Adams, J.M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-8607.

Costantini, P., Bruey, J.M., Castedo, M., Metivier, D., Loeffler, M., Susin, S.A., Ravagnan, L., Zamzami, N., Garrido, C., and Kroemer, G. (2002). Pre-processed caspase-9 contained in mitochondria participates in apoptosis. *Cell Death Differ* 9, 82-88.

Craven, S.E., French, D., Ye, W., de Sauvage, F., and Rosenthal, A. (2005). Loss of Hspa9b in zebrafish recapitulates the ineffective hematopoiesis of the myelodysplastic syndrome. *Blood* 105, 3528-3534.

Creagh, E.M., Carmody, R.J., and Cotter, T.G. (2000). Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and -independent apoptosis in Jurkat T cells. *Exp Cell Res* 257, 58-66.

Crispino, J.D. (2005). GATA1 in normal and malignant hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol* 16, 137-147.

Csermely, P. (2004). Strong links are important, but weak links stabilize them. *Trends Biochem Sci* 29, 331-334.

Csete, M., Rodriguez, L., Wilcox, M., and Chadalavada, S. (2004). Erythropoietin receptor is expressed on adult rat dopaminergic neurons and erythropoietin is neurotrophic in cultured dopaminergic neuroblasts. *Neurosci Lett* 359, 124-126.

Cui, Y., Riedlinger, G., Miyoshi, K., Tang, W., Li, C., Deng, C.X., Robinson, G.W., and Hennighausen, L. (2004). Inactivation of Stat5 in mouse mammary epithelium during pregnancy reveals distinct functions in cell proliferation, survival, and differentiation. *Mol Cell Biol* 24, 8037-8047.

D'Andrea, A.D. (1994). Hematopoietic growth factors and the regulation of differentiative decisions. *Curr Opin Cell Biol* 6, 804-808.

D'Andrea, A.D., Lodish, H.F., and Wong, G.G. (1989). Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell* 57, 277-285.

Dai, C., and Krantz, S.B. (1999). Interferon gamma induces upregulation and activation of caspases 1, 3, and 8 to produce apoptosis in human erythroid progenitor cells. *Blood* 93, 3309-3316.

Dai, C.H., Krantz, S.B., Dessypris, E.N., Means, R.T., Jr., Horn, S.T., and Gilbert, H.S. (1992). Polycythemia vera. II. Hypersensitivity of bone marrow erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocyte progenitor cells to interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 80, 891-899.

Dai, C.H., Krantz, S.B., Green, W.F., and Gilbert, H.S. (1994). Polycythaemia vera. III. Burst-forming units-erythroid (BFU-E) response to stem cell factor and c-kit receptor expression. *Br J Haematol* 86, 12-21.

Dai, C.H., Price, J.O., Brunner, T., and Krantz, S.B. (1998). Fas ligand is present in human erythroid colony-forming cells and interacts with Fas induced by interferon gamma to produce erythroid cell apoptosis. *Blood* 91, 1235-1242.

Dai, Q., Qian, S.B., Li, H.H., McDonough, H., Borchers, C., Huang, D., Takayama, S., Younger, J.M., Ren, H.Y., Cyr, D.M., *et al.* (2005). Regulation of the cytoplasmic quality control protein degradation pathway by BAG2. *J Biol Chem* 280, 38673-38681.

Dallaglio, G., North, M., Worden, B.D., and Means, R.T., Jr. (1999). Inhibition of human erythroid colony formation by ceramide. *Exp Hematol* 27, 1133-1138.

Damen, J.E., Cutler, R.L., Jiao, H., Yi, T., and Krystal, G. (1995). Phosphorylation of tyrosine 503 in the erythropoietin receptor (EpR) is essential for binding the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for EpR-associated PI 3-kinase activity. *J Biol Chem* 270, 23402-23408.

Davies, K.J. (2001). Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* 83, 301-310.

Davis, J.Q., Dansereau, D., Johnstone, R.M., and Bennett, V. (1986). Selective externalization of an ATP-binding protein structurally related to the clathrin-uncoating ATPase/heat shock protein in vesicles containing terminal transferrin receptors during reticulocyte maturation. *J Biol Chem* 261, 15368-15371.

De Botton, S., Sabri, S., Daugas, E., Zermati, Y., Guidotti, J.E., Hermine, O., Kroemer, G., Vainchenker, W., and Debili, N. (2002). Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood* 100, 1310-1317.

De Maria, R., Testa, U., Luchetti, L., Zeuner, A., Stassi, G., Pelosi, E., Riccioni, R., Felli, N., Samoggia, P., and Peschle, C. (1999a). Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood* 93, 796-803.

De Maria, R., Zeuner, A., Eramo, A., Domenichelli, C., Bonci, D., Grignani, F., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Testa, U., and Peschle, C. (1999b). Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 401, 489-493.

Debili, N., Coulombel, L., Croisille, L., Katz, A., Guichard, J., Breton-Gorius, J., and Vainchenker, W. (1996). Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood* 88, 1284-1296.

Debnath, J., Baehrecke, E.H., and Kroemer, G. (2005). Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 1, 66-74.

DeChant, A.K., Dee, K., and Weyman, C.M. (2002). Raf-induced effects on the differentiation and apoptosis of skeletal myoblasts are determined by the level of Raf signaling: abrogation of apoptosis by Raf is downstream of caspase 3 activation. *Oncogene* 21, 5268-5279.

Degtarev, A., Boyce, M., and Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543-8567.

Dekkers, D.W., Comfurius, P., Bevers, E.M., and Zwaal, R.F. (2002). Comparison between Ca²⁺-induced scrambling of various fluorescently labelled lipid analogues in red blood cells. *Biochem J* 362, 741-747.

Delhommeau, F., Pisani, D.F., James, C., Casadevall, N., Constantinescu, S., and Vainchenker, W. (2006). Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. *Cell Mol Life Sci* 63, 2939-2953.

Demand, J., Alberti, S., Patterson, C., and Hohfeld, J. (2001). Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr Biol* 11, 1569-1577.

Denault, J.B., and Salvesen, G.S. (2002). Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev* 102, 4489-4500.

Dessypris, E., Graber, S.E., Krantz, S.B., and Stone, W.J. (1988). Effects of recombinant erythropoietin on the concentration and cycling status of human marrow hematopoietic progenitor cells in vivo. *Blood* 72, 2060-2062.

Deveraux, Q.L., and Reed, J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13, 239-252.

Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsedale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J* 17, 2215-2223.

Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388, 300-304.

Dijkers, P.F., Birkenkamp, K.U., Lam, E.W., Thomas, N.S., Lammers, J.W., Koenderman, L., and Coffey, P.J. (2002). FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J Cell Biol* 156, 531-542.

Dix, D.J., Allen, J.W., Collins, B.W., Mori, C., Nakamura, N., Poorman-Allen, P., Goulding, E.H., and Eddy, E.M. (1996). Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3264-3268.

Djordjevic, S., and Driscoll, P.C. (2002). Structural insight into substrate specificity and regulatory mechanisms of phosphoinositide 3-kinases. *Trends Biochem Sci* 27, 426-432.

Dolznic, H., Habermann, B., Stangl, K., Deiner, E.M., Moriggl, R., Beug, H., and Mullner, E.W. (2002). Apoptosis protection by the Epo target Bcl-X(L) allows factor-independent differentiation of primary erythroblasts. *Curr Biol* 12, 1076-1085.

Dondero, F., Cavaletto, M., Ghezzi, A.R., La Terza, A., Banni, M., and Viarengo, A. (2004). Biochemical characterization and quantitative gene expression analysis of the multi-stress inducible metallothionein from *Tetrahymena thermophila*. *Protist* 155, 157-168.

Donze, D., Townes, T.M., and Bieker, J.J. (1995). Role of erythroid Kruppel-like factor in human gamma- to beta-globin gene switching. *J Biol Chem* 270, 1955-1959.

Drissen, R., Palstra, R.J., Gillemans, N., Splinter, E., Grosveld, F., Philipsen, S., and de Laat, W. (2004). The active spatial organization of the beta-globin locus requires the transcription factor EKLF. *Genes Dev* 18, 2485-2490.

Drissen, R., von Lindern, M., Kolbus, A., Driegen, S., Steinlein, P., Beug, H., Grosveld, F., and Philipsen, S. (2005). The erythroid phenotype of EKLF-null mice: defects in hemoglobin metabolism and membrane stability. *Mol Cell Biol* 25, 5205-5214.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.

Duval, A., Olaru, D., Campos, L., Flandrin, P., Nadal, N., and Guyotat, D. (2006). Expression and prognostic significance of heat-shock proteins in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 91, 713-714.

Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383-424.

Ebert, B.L., Firth, J.D., and Ratcliffe, P.J. (1995). Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J Biol Chem* 270, 29083-29089.

Ehrenreich, H., Hasselblatt, M., Dembowski, C., Cepek, L., Lewczuk, P., Stiefel, M., Rustenbeck, H.H., Breiter, N., Jacob, S., Knerlich, F., *et al.* (2002). Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 8, 495-505.

Ellis, R.J., and Hartl, F.U. (1999). Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr Opin Struct Biol* 9, 102-110.

Ellis, R.J., van der Vies, S.M., and Hemmingsen, S.M. (1989). The molecular chaperone concept. *Biochem Soc Symp* 55, 145-153.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.

Ema, H., and Nakauchi, H. (2003). Self-renewal and lineage restriction of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 13, 508-512.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

Erslev, A. (1953). Humoral regulation of red cell production. *Blood* 8, 349-357.

Esposti, M.D. (2002). The roles of Bid. *Apoptosis* 7, 433-440.

Fadok, V.A., de Cathelineau, A., Daleke, D.L., Henson, P.M., and Bratton, D.L. (2001). Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* 276, 1071-1077.

Fan, Z., Beresford, P.J., Oh, D.Y., Zhang, D., and Lieberman, J. (2003). Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 112, 659-672.

Fang, J., Menon, M., Kapelle, W., Bogacheva, O., Bogachev, O., Houde, E., Browne, S., Sathyanarayana, P., and Wojchowski, D.M. (2007). EPO modulation of cell-cycle regulatory genes, and cell division, in primary bone marrow erythroblasts. *Blood* 110, 2361-2370.

Felli, N., Pedini, F., Zeuner, A., Petrucci, E., Testa, U., Conticello, C., Biffoni, M., Di Cataldo, A., Winkles, J.A., Peschle, C., *et al.* (2005). Multiple members of the TNF superfamily contribute to IFN-gamma-mediated inhibition of erythropoiesis. *J Immunol* 175, 1464-1472.

Fernando, P., Brunette, S., and Megeney, L.A. (2005). Neural stem cell differentiation is dependent upon endogenous caspase 3 activity. *Faseb J* 19, 1671-1673.

Fernando, P., Kelly, J.F., Balazsi, K., Slack, R.S., and Megeney, L.A. (2002). Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11025-11030.

Ferraro-Peyret, C., Quemeneur, L., Flacher, M., Revillard, J.P., and Genestier, L. (2002). Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes. *J Immunol* 169, 4805-4810.

Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M., and Philipsen, S. (2005). GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 25, 1215-1227.

Ferri, K.F., and Kroemer, G. (2001). Mitochondria--the suicide organelles. *Bioessays* 23, 111-115.

Fesik, S.W. (2000). Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 103, 273-282.

Festjens, N., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* 1757, 1371-1387.

Firth, J.D., Ebert, B.L., and Ratcliffe, P.J. (1995). Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J Biol Chem* 270, 21021-21027.

Fischer, U., Janicke, R.U., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10, 76-100.

Flaherty, K.M., DeLuca-Flaherty, C., and McKay, D.B. (1990). Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* 346, 623-628.

Flanagan, J.G., Chan, D.C., and Leder, P. (1991). Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant. *Cell* 64, 1025-1035.

Foley, J.D., Rosenbaum, H., and Griep, A.E. (2004). Temporal regulation of VEID-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin cleavage activity and caspase-6 correlates with organelle loss during lens development. *J Biol Chem* 279, 32142-32150.

Foller, M., Huber, S.M., and Lang, F. (2008). Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life* 60, 661-668.

Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G.E., Capaccioli, S., and Orlandini, S.Z. (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 182, 41-49.

Forrest, D., Erway, L.C., Ng, L., Altschuler, R., and Curran, T. (1996). Thyroid hormone receptor beta is essential for development of auditory function. *Nat Genet* 13, 354-357.

Fox, A.H., Liew, C., Holmes, M., Kowalski, K., Mackay, J., and Crossley, M. (1999). Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *Embo J* 18, 2812-2822.

Fraichard, A., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J.P., Trouillas, J., Dehay, C., Legrand, C., Gauthier, K., Kedinger, M., Malaval, L., *et al.* (1997). The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *Embo J* 16, 4412-4420.

Freson, K., Devriendt, K., Matthijs, G., Van Hoof, A., De Vos, R., Thys, C., Minner, K., Hoylaerts, M.F., Vermynen, J., and Van Geet, C. (2001). Platelet characteristics in patients with X-linked macrothrombocytopenia because of a novel GATA1 mutation. *Blood* 98, 85-92.

Freudenthaler, S.M., Schreeb, K., Korner, T., and Gleiter, C.H. (1999). Angiotensin II increases erythropoietin production in healthy human volunteers. *Eur J Clin Invest* 29, 816-823.

Frontelo, P., Manwani, D., Galdass, M., Karsunky, H., Lohmann, F., Gallagher, P.G., and Bieker, J.J. (2007). Novel role for EKLF in megakaryocyte lineage commitment. *Blood* 110, 3871-3880.

Frost, V., Al-Mehairi, S., and Sinclair, A.J. (2001a). Exploitation of a non-apoptotic caspase to regulate the abundance of the cdkI p27(KIP1) in transformed lymphoid cells. *Oncogene* 20, 2737-2748.

Frost, V., Delikat, S., Al-Mehairi, S., and Sinclair, A.J. (2001b). Regulation of p27KIP1 in Epstein-Barr virus-immortalized lymphoblastoid cell lines involves non-apoptotic caspase cleavage. *J Gen Virol* 82, 3057-3066.

Fruman, D.A., Mauvais-Jarvis, F., Pollard, D.A., Yballe, C.M., Brazil, D., Bronson, R.T., Kahn, C.R., and Cantley, L.C. (2000). Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha. *Nat Genet* 26, 379-382.

Fuentes-Prior, P., and Salvesen, G.S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 384, 201-232.

Fujita, J., Crane, A.M., Souza, M.K., Dejosez, M., Kyba, M., Flavell, R.A., Thomson, J.A., and Zwaka, T.P. (2008). Caspase activity mediates the differentiation of embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2, 595-601.

Fujita, N., and Tsuruo, T. (1998). Involvement of Bcl-2 cleavage in the acceleration of VP-16-induced U937 cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 246, 484-488.

Fujiwara, Y., Browne, C.P., Cunniff, K., Goff, S.C., and Orkin, S.H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12355-12358.

Fukuda, S., Mantel, C.R., and Pelus, L.M. (2004). Survivin regulates hematopoietic progenitor cell proliferation through p21WAF1/Cip1-dependent and -independent pathways. *Blood* 103, 120-127.

Fukuda, S., and Pelus, L.M. (2001). Regulation of the inhibitor-of-apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34(+) cells by hematopoietic growth factors: implication of survivin expression in normal hematopoiesis. *Blood* 98, 2091-2100.

Fukuda, S., and Pelus, L.M. (2002). Elevation of Survivin levels by hematopoietic growth factors occurs in quiescent CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells before cell cycle entry. *Cell Cycle* 1, 322-326.

Gabai, V.L., Mabuchi, K., Mosser, D.D., and Sherman, M.Y. (2002). Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 22, 3415-3424.

Gabai, V.L., Yaglom, J.A., Volloch, V., Meriin, A.B., Force, T., Koutroumanis, M., Massie, B., Mosser, D.D., and Sherman, M.Y. (2000). Hsp72-mediated suppression of c-Jun N-terminal kinase is implicated in development of tolerance to caspase-independent cell death. *Mol Cell Biol* 20, 6826-6836.

Galloway, J.L., Wingert, R.A., Thisse, C., Thisse, B., and Zon, L.I. (2005). Loss of gata1 but not gata2 converts erythropoiesis to myelopoiesis in zebrafish embryos. *Dev Cell* 8, 109-116.

Ganguli, G., Back, J., Sengupta, S., and Wasylyk, B. (2002). The p53 tumour suppressor inhibits glucocorticoid-induced proliferation of erythroid progenitors. *EMBO Rep* 3, 569-574.

Gao, T., and Newton, A.C. (2002). The turn motif is a phosphorylation switch that regulates the binding of Hsp70 to protein kinase C. *J Biol Chem* 277, 31585-31592.

Garcon, L., Rivat, C., James, C., Lacout, C., Camara-Clayette, V., Ugo, V., Lecluse, Y., Bennaceur-Griscelli, A., and Vainchenker, W. (2006). Constitutive activation of STAT5 and Bcl-

xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood* 108, 1551-1554.

Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Zermati, Y., Schmitt, E., and Kroemer, G. (2006a). Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* 5, 2592-2601.

Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C., and Kroemer, G. (2006b). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 13, 1423-1433.

Garrido, C., Gurbuxani, S., Ravagnan, L., and Kroemer, G. (2001). Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 433-442.

Garrido, C., and Kroemer, G. (2004). Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Curr Opin Cell Biol* 16, 639-646.

Garrido, C., and Solary, E. (2003). A role of HSPs in apoptosis through "protein triage"? *Cell Death Differ* 10, 619-620.

Geiduschek, J.B., and Singer, S.J. (1979). Molecular changes in the membranes of mouse erythroid cells accompanying differentiation. *Cell* 16, 149-163.

Geisbrecht, E.R., and Montell, D.J. (2004). A role for Drosophila IAP1-mediated caspase inhibition in Rac-dependent cell migration. *Cell* 118, 111-125.

Geissler, E.N., Ryan, M.A., and Housman, D.E. (1988). The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* 55, 185-192.

Gervais, J.L., Seth, P., and Zhang, H. (1998). Cleavage of CDK inhibitor p21(Cip1/Waf1) by caspases is an early event during DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem* 273, 19207-19212.

Ghaffari, S., Kitidis, C., Zhao, W., Marinkovic, D., Fleming, M.D., Luo, B., Marszalek, J., and Lodish, H.F. (2006). AKT induces erythroid-cell maturation of JAK2-deficient fetal liver progenitor cells and is required for Epo regulation of erythroid-cell differentiation. *Blood* 107, 1888-1891.

Gibellini, D., Bassini, A., Re, M.C., Ponti, C., Miscia, S., Gonelli, A., La Placa, M., and Zauli, G. (2000). Stroma-derived factor 1alpha induces a selective inhibition of human erythroid development via the functional upregulation of Fas/CD95 ligand. *Br J Haematol* 111, 432-440.

Gillemans, N., Tewari, R., Lindeboom, F., Rottier, R., de Wit, T., Wijgerde, M., Grosveld, F., and Philipsen, S. (1998). Altered DNA-binding specificity mutants of EKLF and Sp1 show that EKLF is an activator of the beta-globin locus control region in vivo. *Genes Dev* 12, 2863-2873.

Gleadle, J.M., Ebert, B.L., Firth, J.D., and Ratcliffe, P.J. (1995). Regulation of angiogenic growth factor expression by hypoxia, transition metals, and chelating agents. *Am J Physiol* 268, C1362-1368.

Goldsmith, M.A., Mikami, A., You, Y., Liu, K.D., Thomas, L., Pharr, P., and Longmore, G.D. (1998). Absence of cytokine receptor-dependent specificity in red blood cell differentiation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7006-7011.

Goloubinoff, P., and De Los Rios, P. (2007). The mechanism of Hsp70 chaperones: (entropic) pulling the models together. *Trends Biochem Sci* 32, 372-380.

Golpon, H.A., Fadok, V.A., Taraseviciene-Stewart, L., Scerbavicius, R., Sauer, C., Welte, T., Henson, P.M., and Voelkel, N.F. (2004). Life after corpse engulfment: phagocytosis of apoptotic cells leads to VEGF secretion and cell growth. *Faseb J* 18, 1716-1718.

Golstein, P., and Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 32, 37-43.

Gordan, J.D., and Simon, M.C. (2007). Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev* 17, 71-77.

Gordeuk, V.R., Stockton, D.W., and Prchal, J.T. (2005). Congenital polycythemia/erythrocytoses. *Haematologica* 90, 109-116.

Gorio, A., Gokmen, N., Erbayraktar, S., Yilmaz, O., Madaschi, L., Cichetti, C., Di Giulio, A.M., Vardar, E., Cerami, A., and Brines, M. (2002). Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9450-9455.

Gorman, A.M., Szegezdi, E., Quigney, D.J., and Samali, A. (2005). Hsp27 inhibits 6-hydroxydopamine-induced cytochrome c release and apoptosis in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 801-810.

Gotz, R., Kramer, B.W., Camarero, G., and Rapp, U.R. (2004). BAG-1 haplo-insufficiency impairs lung tumorigenesis. *BMC Cancer* 4, 85.

Gould, A.B., Goodman, S.A., and Green, D. (1973). An in vivo effect of renin on erythropoietin formation. *Lab Invest* 28, 719-722.

Grass, J.A., Boyer, M.E., Pal, S., Wu, J., Weiss, M.J., and Bresnick, E.H. (2003). GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8811-8816.

Green, D.R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-629.

Greenhalgh, D.G. (1998). The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 30, 1019-1030.

Gregoli, P.A., and Bondurant, M.C. (1997). The roles of Bcl-X(L) and apopain in the control of erythropoiesis by erythropoietin. *Blood* 90, 630-640.

Gregoli, P.A., and Bondurant, M.C. (1999). Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythroid progenitors. *J Cell Physiol* 178, 133-143.

Gregory, C.J., and Eaves, A.C. (1978). Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood* 51, 527-537.

Gregory, R.C., Jiang, N., Todokoro, K., Crouse, J., Pacifici, R.E., and Wojchowski, D.M. (1998). Erythropoietin receptor and STAT5-specific pathways promote SKT6 cell hemoglobinization. *Blood* 92, 1104-1118.

Gregory, R.C., Taxman, D.J., Seshasayee, D., Kensinger, M.H., Bieker, J.J., and Wojchowski, D.M. (1996). Functional interaction of GATA1 with erythroid Kruppel-like factor and Sp1 at defined erythroid promoters. *Blood* 87, 1793-1801.

Gregory, T., Yu, C., Ma, A., Orkin, S.H., Blobel, G.A., and Weiss, M.J. (1999). GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood* 94, 87-96.

Grigoryev, S.A., Solovieva, V.O., Spirin, K.S., and Krasheninnikov, I.A. (1992). A novel nonhistone protein (MENT) promotes nuclear collapse at the terminal stage of avian erythropoiesis. *Exp Cell Res* 198, 268-275.

Grigoryev, S.A., and Woodcock, C.L. (1993). Stage-specific expression and localization of MENT, a nuclear protein associated with chromatin condensation in terminally differentiating avian erythroid cells. *Exp Cell Res* 206, 335-343.

Grillot, D.A., Gonzalez-Garcia, M., Ekhterae, D., Duan, L., Inohara, N., Ohta, S., Seldin, M.F., and Nunez, G. (1997). Genomic organization, promoter region analysis, and chromosome localization of the mouse bcl-x gene. *J Immunol* 158, 4750-4757.

Grimm, S., Stanger, B.Z., and Leder, P. (1996). RIP and FADD: two "death domain"-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable, pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10923-10927.

Grzasko, N., Dmoszynska, A., Hus, M., and Soroka-Wojtaszko, M. (2006). Stimulation of erythropoiesis by thalidomide in multiple myeloma patients: its influence on FasL, TRAIL and their receptors on erythroblasts. *Haematologica* 91, 386-389.

Guo, F., Sigua, C., Bali, P., George, P., Fiskus, W., Scuto, A., Annavarapu, S., Mouttaki, A., Sondarva, G., Wei, S., *et al.* (2005). Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood* 105, 1246-1255.

Guo, Y., Lubbert, M., and Engelhardt, M. (2003). CD34- hematopoietic stem cells: current concepts and controversies. *Stem Cells* 21, 15-20.

Gurbuxani, S., Schmitt, E., Cande, C., Parcellier, A., Hammann, A., Daugas, E., Kouranti, I., Spahr, C., Pance, A., Kroemer, G., *et al.* (2003). Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene* 22, 6669-6678.

Gurbuxani, S., Vyas, P., and Crispino, J.D. (2004). Recent insights into the mechanisms of myeloid leukemogenesis in Down syndrome. *Blood* 103, 399-406.

Gurbuxani, S., Xu, Y., Keerthivasan, G., Wickrema, A., and Crispino, J.D. (2005). Differential requirements for survivin in hematopoietic cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11480-11485.

Gusarova, V., Caplan, A.J., Brodsky, J.L., and Fisher, E.A. (2001). Apoprotein B degradation is promoted by the molecular chaperones hsp90 and hsp70. *J Biol Chem* 276, 24891-24900.

Hafid-Medheb, K., Augery-Bourget, Y., Minatchy, M.N., Hanania, N., and Robert-Lezenes, J. (2003). Bcl-XL is required for heme synthesis during the chemical induction of erythroid differentiation of murine erythroleukemia cells independently of its antiapoptotic function. *Blood* 101, 2575-2583.

Hall, M.A., Curtis, D.J., Metcalf, D., Elefanty, A.G., Sourris, K., Robb, L., Gothert, J.R., Jane, S.M., and Begley, C.G. (2003). The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 992-997.

Halupa, A., Bailey, M.L., Huang, K., Iscove, N.N., Levy, D.E., and Barber, D.L. (2005). A novel role for STAT1 in regulating murine erythropoiesis: deletion of STAT1 results in overall reduction of erythroid progenitors and alters their distribution. *Blood* 105, 552-561.

Hanspal, M., Smockova, Y., and Uong, Q. (1998). Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages. *Blood* 92, 2940-2950.

Harashima, A., Suzuki, M., Okochi, A., Yamamoto, M., Matsuo, Y., Motoda, R., Yoshioka, T., and Orita, K. (2002). CD45 tyrosine phosphatase inhibits erythroid differentiation of umbilical cord blood CD34+ cells associated with selective inactivation of Lyn. *Blood* 100, 4440-4445.

Harman, D. (1992). Role of free radicals in aging and disease. *Ann N Y Acad Sci* 673, 126-141.

Harrison, C.J., Hayer-Hartl, M., Di Liberto, M., Hartl, F., and Kuriyan, J. (1997). Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science* 276, 431-435.

Haseyama, Y., Sawada, K., Oda, A., Koizumi, K., Takano, H., Tarumi, T., Nishio, M., Handa, M., Ikeda, Y., and Koike, T. (1999). Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the protection of primary cultured human erythroid precursor cells from apoptosis. *Blood* 94, 1568-1577.

Haughn, L., Hawley, R.G., Morrison, D.K., von Boehmer, H., and Hockenbery, D.M. (2003). BCL-2 and BCL-XL restrict lineage choice during hematopoietic differentiation. *J Biol Chem* 278, 25158-25165.

Helfer, B., Boswell, B.C., Finlay, D., Cipres, A., Vuori, K., Bong Kang, T., Wallach, D., Dorfleutner, A., Lahti, J.M., Flynn, D.C., *et al.* (2006). Caspase-8 promotes cell motility and calpain activity under nonapoptotic conditions. *Cancer Res* 66, 4273-4278.

Hengartner, M.O. (1999). Programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Recent Prog Horm Res* 54, 213-222; discussion 222-214.

Hengartner, M.O., and Horvitz, H.R. (1994a). *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76, 665-676.

Hengartner, M.O., and Horvitz, H.R. (1994b). Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* 4, 581-586.

Henke, M., Laszig, R., Rube, C., Schafer, U., Haase, K.D., Schilcher, B., Mose, S., Beer, K.T., Burger, U., Dougherty, C., *et al.* (2003). Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 362, 1255-1260.

Hennighausen, L., and Robinson, G.W. (2008). Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B. *Genes Dev* 22, 711-721.

Henry, D.H. (2004). The evolving role of epoetin alfa in cancer therapy. *Oncologist* 9, 97-107.

Hernandez-Hernandez, A., Ray, P., Litos, G., Ciro, M., Ottolenghi, S., Beug, H., and Boyes, J. (2006). Acetylation and MAPK phosphorylation cooperate to regulate the degradation of active GATA-1. *Embo J* 25, 3264-3274.

Hero, M., Wickman, S., Hanhijarvi, R., Siimes, M.A., and Dunkel, L. (2005). Pubertal upregulation of erythropoiesis in boys is determined primarily by androgen. *J Pediatr* 146, 245-252.

Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.O., Marshall, H.E., and Stamler, J.S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 150-166.

Heusel, J.W., Wesselschmidt, R.L., Shresta, S., Russell, J.H., and Ley, T.J. (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76, 977-987.

Heynen, M.J., Tricot, G., and Verwilghen, R.L. (1985). Autophagy of mitochondria in rat bone marrow erythroid cells. Relation to nuclear extrusion. *Cell Tissue Res* 239, 235-239.

Hino, M., Tojo, A., Miyazono, K., Urabe, A., and Takaku, F. (1988). Effects of type beta transforming growth factors on haematopoietic progenitor cells. *Br J Haematol* 70, 143-147.

Hitzler, J.K., and Zipursky, A. (2005). Origins of leukaemia in children with Down syndrome. *Nat Rev Cancer* 5, 11-20.

Hodge, D., Coghill, E., Keys, J., Maguire, T., Hartmann, B., McDowall, A., Weiss, M., Grimmond, S., and Perkins, A. (2006). A global role for EKLF in definitive and primitive erythropoiesis. *Blood* 107, 3359-3370.

Hofmann, W.K., and Koeffler, H.P. (2002). Important features of myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol* 76 Suppl 2, 222-227.

Hollanda, L.M., Lima, C.S., Cunha, A.F., Albuquerque, D.M., Vassallo, J., Ozelo, M.C., Joazeiro, P.P., Saad, S.T., and Costa, F.F. (2006). An inherited mutation leading to production of only the short isoform of GATA-1 is associated with impaired erythropoiesis. *Nat Genet* 38, 807-812.

Holm, T.M., Braun, A., Trigatti, B.L., Brugnara, C., Sakamoto, M., Krieger, M., and Andrews, N.C. (2002). Failure of red blood cell maturation in mice with defects in the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Blood* 99, 1817-1824.

Hong, L., Ramdas, B., Chen, J., Harris, C., Wojchowski, D.M., and Kapur, R. (2008). KIT associated intracellular tyrosines play an essential role in EpoR co-signaling. *Cell Signal* 20, 1513-1520.

Horton, L., Coburn, R.J., England, J.M., and Himsworth, R.L. (1976). The haematology of hypothyroidism. *Q J Med* 45, 101-123.

Horvitz, H.R. (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* 59, 1701s-1706s.

Hristoskova, S., Holzgreve, W., Hahn, S., and Rusterholz, C. (2007). Human mature erythroblasts are resistant to apoptosis. *Exp Cell Res* 313, 1024-1032.

Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D.V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81, 495-504.

Hu, Y., Ding, L., Spencer, D.M., and Nunez, G. (1998). WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 273, 33489-33494.

Huang, L.J., Constantinescu, S.N., and Lodish, H.F. (2001). The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell* 8, 1327-1338.

Huddleston, H., Tan, B., Yang, F.C., White, H., Wenning, M.J., Orazi, A., Yoder, M.C., Kapur, R., and Ingram, D.A. (2003). Functional p85alpha gene is required for normal murine fetal erythropoiesis. *Blood* 102, 142-145.

Hudgson, P., Pearce, J.M., and Yeates, W.K. (1967). Renal artery stenosis with hypertension and high haematocrit. *Br Med J* 1, 18-21.

Huh, J.R., Vernooy, S.Y., Yu, H., Yan, N., Shi, Y., Guo, M., and Hay, B.A. (2004). Multiple apoptotic caspase cascades are required in nonapoptotic roles for *Drosophila* spermatid individualization. *PLoS Biol* 2, E15.

Hung, H.L., Kim, A.Y., Hong, W., Rakowski, C., and Blobel, G.A. (2001). Stimulation of NF-E2 DNA binding by CREB-binding protein (CBP)-mediated acetylation. *J Biol Chem* 276, 10715-10721.

Hung, H.L., Lau, J., Kim, A.Y., Weiss, M.J., and Blobel, G.A. (1999). CREB-Binding protein acetylates hematopoietic transcription factor GATA-1 at functionally important sites. *Mol Cell Biol* 19, 3496-3505.

Huppertz, B., Tews, D.S., and Kaufmann, P. (2001). Apoptosis and syncytial fusion in human placental trophoblast and skeletal muscle. *Int Rev Cytol* 205, 215-253.

Igney, F.H., and Krammer, P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2, 277-288.

Im, H., Grass, J.A., Johnson, K.D., Kim, S.I., Boyer, M.E., Imbalzano, A.N., Bieker, J.J., and Bresnick, E.H. (2005). Chromatin domain activation via GATA-1 utilization of a small subset of dispersed GATA motifs within a broad chromosomal region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17065-17070.

Imazu, T., Shimizu, S., Tagami, S., Matsushima, M., Nakamura, Y., Miki, T., Okuyama, A., and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like protein (Bnip3L) interacts with bcl-2/Bcl-xL and induces apoptosis by altering mitochondrial membrane permeability. *Oncogene* 18, 4523-4529.

Ingle, E., McCarthy, D.J., Pore, J.R., Sarna, M.K., Adenan, A.S., Wright, M.J., Erber, W., Tilbrook, P.A., and Klinken, S.P. (2005). Lyn deficiency reduces GATA-1, EKLF and STAT5, and induces extramedullary stress erythropoiesis. *Oncogene* 24, 336-343.

Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.

Iscove, N.N. (1977). The role of erythropoietin in regulation of population size and cell cycling of early and late erythroid precursors in mouse bone marrow. *Cell Tissue Kinet* 10, 323-334.

Iscove, N.N., Sieber, F., and Winterhalter, K.H. (1974). Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow: analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin A. *J Cell Physiol* 83, 309-320.

Ishizaki, Y., Jacobson, M.D., and Raff, M.C. (1998). A role for caspases in lens fiber differentiation. *J Cell Biol* 140, 153-158.

Italiano, J.E., Jr., Lecine, P., Shivdasani, R.A., and Hartwig, J.H. (1999). Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol* 147, 1299-1312.

Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., and Kaelin, W.G., Jr. (2001). HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292, 464-468.

Jaattela, M. (1993). Overexpression of major heat shock protein hsp70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A₂. *J Immunol* 151, 4286-4294.

Jaattela, M. (1999). Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med* 31, 261-271.

Jaattela, M., Wissing, D., Bauer, P.A., and Li, G.C. (1992). Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *Embo J* 11, 3507-3512.

Jaattela, M., Wissing, D., Kokholm, K., Kallunki, T., and Egeblad, M. (1998). Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *Embo J* 17, 6124-6134.

Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E.M., Bronson, R.T., Goodell, M.A., and Weinberg, R.A. (1992). Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 359, 295-300.

Jacobs-Helber, S.M., Penta, K., Sun, Z., Lawson, A., and Sawyer, S.T. (1997). Distinct signaling from stem cell factor and erythropoietin in HCD57 cells. *J Biol Chem* 272, 6850-6853.

Jacobs-Helber, S.M., Roh, K.H., Bailey, D., Dessypris, E.N., Ryan, J.J., Chen, J., Wickrema, A., Barber, D.L., Dent, P., and Sawyer, S.T. (2003). Tumor necrosis factor- α expressed constitutively in erythroid cells or induced by erythropoietin has negative and stimulatory roles in normal erythropoiesis and erythroleukemia. *Blood* 101, 524-531.

Jacobs-Helber, S.M., and Sawyer, S.T. (2004). Jun N-terminal kinase promotes proliferation of immature erythroid cells and erythropoietin-dependent cell lines. *Blood* 104, 696-703.

James, A.A., and Bryant, P.J. (1981). A quantitative study of cell death and mitotic inhibition in gamma-irradiated imaginal wing discs of *Drosophila melanogaster*. *Radiat Res* 87, 552-564.

James, C., Ugo, V., Le Couedic, J.P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garcon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., *et al.* (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144-1148.

Jelkmann, W. (1992). Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 72, 449-489.

Ji, M., Li, H., Suh, H.C., Klarmann, K.D., Yokota, Y., and Keller, J.R. (2008). Id2 intrinsically regulates lymphoid and erythroid development via interaction with different target proteins. *Blood* 112, 1068-1077.

Jiang, N., He, T.C., Miyajima, A., and Wojchowski, D.M. (1996). The box1 domain of the erythropoietin receptor specifies Janus kinase 2 activation and functions mitogenically within an interleukin 2 beta-receptor chimera. *J Biol Chem* 271, 16472-16476.

Jiang, X., and Wang, X. (2000). Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem* 275, 31199-31203.

Johnson, K.D., Christensen, H.M., Zhao, B., and Bresnick, E.H. (2001). Distinct mechanisms control RNA polymerase II recruitment to a tissue-specific locus control region and a downstream promoter. *Mol Cell* 8, 465-471.

Johnson, K.D., Grass, J.A., Boyer, M.E., Kiekhäfer, C.M., Blobel, G.A., Weiss, M.J., and Bresnick, E.H. (2002). Cooperative activities of hematopoietic regulators recruit RNA polymerase II to a tissue-specific chromatin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11760-11765.

Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, R.T., Umanoff, H., Edelmann, W., Kucherlapati, R., *et al.* (1997). K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev* *11*, 2468-2481.

Jones, S.S., D'Andrea, A.D., Haines, L.L., and Wong, G.G. (1990). Human erythropoietin receptor: cloning, expression, and biologic characterization. *Blood* *76*, 31-35.

Josefsen, D., Myklebust, J.H., Lomo, J., Sioud, M., Blomhoff, H.K., and Smeland, E.B. (2000). Differential expression of bcl-2 homologs in human CD34(+) hematopoietic progenitor cells induced to differentiate into erythroid or granulocytic cells. *Stem Cells* *18*, 261-272.

Joza, N., Kroemer, G., and Penninger, J.M. (2002). Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genet* *18*, 142-149.

Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., *et al.* (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* *410*, 549-554.

Jubinsky, P.T., Krijanovski, O.I., Nathan, D.G., Tavernier, J., and Sieff, C.A. (1997). The beta chain of the interleukin-3 receptor functionally associates with the erythropoietin receptor. *Blood* *90*, 1867-1873.

Juul, S.E., Yachnis, A.T., and Christensen, R.D. (1998). Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus. *Early Hum Dev* *52*, 235-249.

Kabakov, A.E., and Gabai, V.L. (1995). Heat shock-induced accumulation of 70-kDa stress protein (HSP70) can protect ATP-depleted tumor cells from necrosis. *Exp Cell Res* *217*, 15-21.

Kadri, Z., Maouche-Chretien, L., Rooke, H.M., Orkin, S.H., Romeo, P.H., Mayeux, P., Leboulch, P., and Chretien, S. (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt induced by erythropoietin renders the erythroid differentiation factor GATA-1 competent for TIMP-1 gene transactivation. *Mol Cell Biol* *25*, 7412-7422.

Kalfa, T.A., Pushkaran, S., Mohandas, N., Hartwig, J.H., Fowler, V.M., Johnson, J.F., Joiner, C.H., Williams, D.A., and Zheng, Y. (2006). Rac GTPases regulate the morphology and deformability of the erythrocyte cytoskeleton. *Blood* *108*, 3637-3645.

Kalinowska, M., Garncarz, W., Pietrowska, M., Garrard, W.T., and Widlak, P. (2005). Regulation of the human apoptotic DNase/RNase endonuclease G: involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis* *10*, 821-830.

Kaluzhny, Y., Yu, G., Sun, S., Toselli, P.A., Nieswandt, B., Jackson, C.W., and Ravid, K. (2002). BclxL overexpression in megakaryocytes leads to impaired platelet fragmentation. *Blood* *100*, 1670-1678.

Kang, T.B., Ben-Moshe, T., Varfolomeev, E.E., Pewzner-Jung, Y., Yogev, N., Jurewicz, A., Waisman, A., Brenner, O., Haffner, R., Gustafsson, E., *et al.* (2004). Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J Immunol* *173*, 2976-2984.

Kapur, R., Cooper, R., Xiao, X., Weiss, M.J., Donovan, P., and Williams, D.A. (1999). The presence of novel amino acids in the cytoplasmic domain of stem cell factor results in hematopoietic defects in Steel(17H) mice. *Blood* *94*, 1915-1925.

Karur, V.G., Lowell, C.A., Besmer, P., Agosti, V., and Wojchowski, D.M. (2006). Lyn kinase promotes erythroblast expansion and late-stage development. *Blood* *108*, 1524-1532.

Kashii, Y., Uchida, M., Kirito, K., Tanaka, M., Nishijima, K., Toshima, M., Ando, T., Koizumi, K., Endoh, T., Sawada, K., *et al.* (2000). A member of Forkhead family transcription factor, FKHL1, is one of the downstream molecules of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction. *Blood* *96*, 941-949.

Kassouf, M.T., Chagraoui, H., Vyas, P., and Porcher, C. (2008). Differential use of SCL/TAL-1 DNA-binding domain in developmental hematopoiesis. *Blood* *112*, 1056-1067.

Kato, H., Ishida, J., Imagawa, S., Saito, T., Suzuki, N., Matsuoka, T., Sugaya, T., Tanimoto, K., Yokoo, T., Ohneda, O., *et al.* (2005). Enhanced erythropoiesis mediated by activation of the renin-angiotensin system via angiotensin II type 1a receptor. *Faseb J* 19, 2023-2025.

Kaufman, R.J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13, 1211-1233.

Kaufmann, S.H., and Hengartner, M.O. (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 11, 526-534.

Kawane, K., Fukuyama, H., Kondoh, G., Takeda, J., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., and Nagata, S. (2001). Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science* 292, 1546-1549.

Kaye, F.J., Modi, S., Ivanovska, I., Koonin, E.V., Thress, K., Kubo, A., Kornbluth, S., and Rose, M.D. (2000). A family of ubiquitin-like proteins binds the ATPase domain of Hsp70-like Stch. *FEBS Lett* 467, 348-355.

Keller, M., Ruegg, A., Werner, S., and Beer, H.D. (2008). Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 132, 818-831.

Kent, G., Minick, O.T., Volini, F.I., and Orfei, E. (1966). Autophagic vacuoles in human red cells. *Am J Pathol* 48, 831-857.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.

Khalaf, W.F., White, H., Wenning, M.J., Orazi, A., Kapur, R., and Ingram, D.A. (2005). K-Ras is essential for normal fetal liver erythropoiesis. *Blood* 105, 3538-3541.

Khetawat, G., Faraday, N., Nealen, M.L., Vijayan, K.V., Bolton, E., Noga, S.J., and Bray, P.F. (2000). Human megakaryocytes and platelets contain the estrogen receptor beta and androgen receptor (AR): testosterone regulates AR expression. *Blood* 95, 2289-2296.

Kiefer, C.R., and Snyder, L.M. (2000). Oxidation and erythrocyte senescence. *Curr Opin Hematol* 7, 113-116.

Kim, H., Whartenby, K.A., Georgantas, R.W., 3rd, Wingard, J., and Civin, C.I. (2002). Human CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells express high levels of FLIP and are resistant to Fas-mediated apoptosis. *Stem Cells* 20, 174-182.

Kim, S.I., and Bresnick, E.H. (2007). Transcriptional control of erythropoiesis: emerging mechanisms and principles. *Oncogene* 26, 6777-6794.

Kirito, K., Nakajima, K., Watanabe, T., Uchida, M., Tanaka, M., Ozawa, K., and Komatsu, N. (2002). Identification of the human erythropoietin receptor region required for Stat1 and Stat3 activation. *Blood* 99, 102-110.

Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579-5588.

Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., and Ashkenazi, A. (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 276, 46639-46646.

Kitagawa, M., Saito, I., Kuwata, T., Yoshida, S., Yamaguchi, S., Takahashi, M., Tanizawa, T., Kamiyama, R., and Hirokawa, K. (1997). Overexpression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interferon (IFN)-gamma by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 11, 2049-2054.

Klingmuller, U., Lorenz, U., Cantley, L.C., Neel, B.G., and Lodish, H.F. (1995). Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 80, 729-738.

Klingmuller, U., Wu, H., Hsiao, J.G., Toker, A., Duckworth, B.C., Cantley, L.C., and Lodish, H.F. (1997). Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 3016-3021.

Koch, M.H., Sayers, Z., Michon, A.M., Marquet, R., Houssier, C., and Willfuhr, J. (1988). The superstructure of chromatin and its condensation mechanism. V. Effect of linker length, condensation by multivalent cations, solubility and electric dichroism properties. *Eur Biophys J* *16*, 177-185.

Koera, K., Nakamura, K., Nakao, K., Miyoshi, J., Toyoshima, K., Hatta, T., Otani, H., Aiba, A., and Katsuki, M. (1997). K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene* *15*, 1151-1159.

Kolbus, A., Blazquez-Domingo, M., Carotta, S., Bakker, W., Luedemann, S., von Lindern, M., Steinlein, P., and Beug, H. (2003). Cooperative signaling between cytokine receptors and the glucocorticoid receptor in the expansion of erythroid progenitors: molecular analysis by expression profiling. *Blood* *102*, 3136-3146.

Kolbus, A., Pilat, S., Husak, Z., Deiner, E.M., Stengl, G., Beug, H., and Baccarini, M. (2002). Raf-1 antagonizes erythroid differentiation by restraining caspase activation. *J Exp Med* *196*, 1347-1353.

Komarova, E.Y., Afanasyeva, E.A., Bulatova, M.M., Cheetham, M.E., Margulis, B.A., and Guzhova, I.V. (2004). Downstream caspases are novel targets for the antiapoptotic activity of the molecular chaperone hsp70. *Cell Stress Chaperones* *9*, 265-275.

Kondo, M., Akashi, K., Domen, J., Sugamura, K., and Weissman, I.L. (1997). Bcl-2 rescues T lymphopoiesis, but not B or NK cell development, in common gamma chain-deficient mice. *Immunity* *7*, 155-162.

Kondo, M., Wagers, A.J., Manz, M.G., Prohaska, S.S., Scherer, D.C., Beilhack, G.F., Shizuru, J.A., and Weissman, I.L. (2003). Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* *21*, 759-806.

Korcsmaros, T., Kovacs, I.A., Szalay, M.S., and Csermely, P. (2007). Molecular chaperones: the modular evolution of cellular networks. *J Biosci* *32*, 441-446.

Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J., and Schlesinger, P.H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* *7*, 1166-1173.

Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J., *et al.* (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* *278*, 294-298.

Koury, M.J., and Bondurant, M.C. (1990). Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* *248*, 378-381.

Koury, M.J., Koury, S.T., Kopsombut, P., and Bondurant, M.C. (2005). In vitro maturation of nascent reticulocytes to erythrocytes. *Blood* *105*, 2168-2174.

Koury, S.T., Bondurant, M.C., Koury, M.J., and Semenza, G.L. (1991). Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood* *77*, 2497-2503.

Koury, S.T., Koury, M.J., and Bondurant, M.C. (1989a). Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. *J Cell Biol* *109*, 3005-3013.

Koury, S.T., Koury, M.J., Bondurant, M.C., Caro, J., and Graber, S.E. (1989b). Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood* *74*, 645-651.

Kozuma, Y., Kojima, H., Yuki, S., Suzuki, H., and Nagasawa, T. (2007). Continuous expression of Bcl-xL protein during megakaryopoiesis is post-translationally regulated by thrombopoietin-

mediated Akt activation, which prevents the cleavage of Bcl-xL. *J Thromb Haemost* 5, 1274-1282.

Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A.S., Teo, S.S., Tiedt, R., Passweg, J.R., Tichelli, A., Cazzola, M., and Skoda, R.C. (2005). A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352, 1779-1790.

Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I., and May, W.S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87, 1-13.

Krauss, S.W., Lo, A.J., Short, S.A., Koury, M.J., Mohandas, N., and Chasis, J.A. (2005). Nuclear substructure reorganization during late-stage erythropoiesis is selective and does not involve caspase cleavage of major nuclear substructural proteins. *Blood* 106, 2200-2205.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., *et al.* (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16, 3-11.

Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P.H., and Kirchhoff, S. (2001). Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 276, 20633-20640.

Kruger, I., Vollmer, M., Simmons, D.G., Elsasser, H.P., Philipsen, S., and Suske, G. (2007). Sp1/Sp3 compound heterozygous mice are not viable: impaired erythropoiesis and severe placental defects. *Dev Dyn* 236, 2235-2244.

Kubatzy, K.F., Ruan, W., Gurezka, R., Cohen, J., Ketteler, R., Watowich, S.S., Neumann, D., Langosch, D., and Klingmuller, U. (2001). Self assembly of the transmembrane domain promotes signal transduction through the erythropoietin receptor. *Curr Biol* 11, 110-115.

Kuo, Y.Y., and Chang, Z.F. (2007). GATA-1 and Gfi-1B interplay to regulate Bcl-xL transcription. *Mol Cell Biol* 27, 4261-4272.

Kurtz, A., Jelkmann, W., and Bauer, C. (1982). A new candidate for the regulation of erythropoiesis. Insulin-like growth factor I. *FEBS Lett* 149, 105-108.

Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111, 331-342.

Lacout, C., Pisani, D.F., Tulliez, M., Gachelin, F.M., Vainchenker, W., and Villeval, J.L. (2006). JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood* 108, 1652-1660.

Lahlil, R., Lecuyer, E., Herblot, S., and Hoang, T. (2004). SCL assembles a multifactorial complex that determines glycophorin A expression. *Mol Cell Biol* 24, 1439-1452.

Lamkanfi, M., D'Hondt, K., Vande Walle, L., van Gurp, M., Denecker, G., Demeulemeester, J., Kalai, M., Declercq, W., Saelens, X., and Vandenabeele, P. (2005). A novel caspase-2 complex containing TRAF2 and RIP1. *J Biol Chem* 280, 6923-6932.

Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X., and Vandenabeele, P. (2002). Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ* 9, 358-361.

Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* 14, 44-55.

Lamkanfi, M., Kalai, M., Saelens, X., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2004). Caspase-1 activates nuclear factor of the kappa-enhancer in B cells independently of its enzymatic activity. *J Biol Chem* 279, 24785-24793.

Lamonica, J.M., Vakoc, C.R., and Blobel, G.A. (2006). Acetylation of GATA-1 is required for chromatin occupancy. *Blood* 108, 3736-3738.

Lando, D., Peet, D.J., Whelan, D.A., Gorman, J.J., and Whitelaw, M.L. (2002). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295, 858-861.

Lang, F., Lang, K.S., Lang, P.A., Huber, S.M., and Wieder, T. (2006). Mechanisms and significance of eryptosis. *Antioxid Redox Signal* 8, 1183-1192.

Lang, K.S., Lang, P.A., Bauer, C., Duranton, C., Wieder, T., Huber, S.M., and Lang, F. (2005). Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 15, 195-202.

Lang, P.A., Kaiser, S., Myssina, S., Wieder, T., Lang, F., and Huber, S.M. (2003). Role of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C1553-1560.

Lanneau, D., Brunet, M., Frisan, E., Solary, E., Fontenay, M., and Garrido, C. (2008). Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med* 12, 743-761.

Launay, S., Hermine, O., Fontenay, M., Kroemer, G., Solary, E., and Garrido, C. (2005). Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* 24, 5137-5148.

Lavrik, I.N., Golks, A., Baumann, S., and Krammer, P.H. (2006). Caspase-2 is activated at the CD95 death-inducing signaling complex in the course of CD95-induced apoptosis. *Blood* 108, 559-565.

Law, M.L., Cai, G.Y., Lin, F.K., Wei, Q., Huang, S.Z., Hartz, J.H., Morse, H., Lin, C.H., Jones, C., and Kao, F.T. (1986). Chromosomal assignment of the human erythropoietin gene and its DNA polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6920-6924.

Leberbauer, C., Boulme, F., Unfried, G., Huber, J., Beug, H., and Mullner, E.W. (2005). Different steroids co-regulate long-term expansion versus terminal differentiation in primary human erythroid progenitors. *Blood* 105, 85-94.

Lee, E.Y., Chang, C.Y., Hu, N., Wang, Y.C., Lai, C.C., Herrup, K., Lee, W.H., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 359, 288-294.

Lee, F.S., Percy, M.J., and McMullin, M.F. (2006a). Oxygen sensing: recent insights from idiopathic erythrocytosis. *Cell Cycle* 5, 941-945.

Lee, G., Lo, A., Short, S.A., Mankelaw, T.J., Spring, F., Parsons, S.F., Yazdanbakhsh, K., Mohandas, N., Anstee, D.J., and Chasis, J.A. (2006b). Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation. *Blood* 108, 2064-2071.

Lee, J.C., Gimm, J.A., Lo, A.J., Koury, M.J., Krauss, S.W., Mohandas, N., and Chasis, J.A. (2004). Mechanism of protein sorting during erythroblast enucleation: role of cytoskeletal connectivity. *Blood* 103, 1912-1919.

Lemmers, B., Salmena, L., Bidere, N., Su, H., Matysiak-Zablocki, E., Murakami, K., Ohashi, P.S., Jurisicova, A., Lenardo, M., Hakem, R., *et al.* (2007). Essential role for caspase-8 in Toll-like receptors and NFkappaB signaling. *J Biol Chem* 282, 7416-7423.

Lenox, L.E., Perry, J.M., and Paulson, R.F. (2005). BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia. *Blood* 105, 2741-2748.

Leonard, M., Brice, M., Engel, J.D., and Papayannopoulou, T. (1993). Dynamics of GATA transcription factor expression during erythroid differentiation. *Blood* 82, 1071-1079.

Leppa, S., Pirkkala, L., Saarento, H., Sarge, K.D., and Sistonen, L. (1997). Overexpression of HSF2-beta inhibits hemin-induced heat shock gene expression and erythroid differentiation in K562 cells. *J Biol Chem* 272, 15293-15298.

Letting, D.L., Chen, Y.Y., Rakowski, C., Reedy, S., and Blobel, G.A. (2004). Context-dependent regulation of GATA-1 by friend of GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 476-481.

Leulier, F., Rodriguez, A., Khush, R.S., Abrams, J.M., and Lemaitre, B. (2000). The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist gram-negative bacterial infection. *EMBO Rep* 1, 353-358.

Leung, C.G., Xu, Y., Mularski, B., Liu, H., Gurbuxani, S., and Crispino, J.D. (2007). Requirements for survivin in terminal differentiation of erythroid cells and maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells. *J Exp Med* 204, 1603-1611.

Levine, R.L., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B.L., Wernig, G., Huntly, B.J., Boggon, T.J., Wlodarska, I., Clark, J.J., Moore, S., *et al.* (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7, 387-397.

Leyland-Jones, B. (2003). Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. *Lancet Oncol* 4, 459-460.

Li, C.Y., Lee, J.S., Ko, Y.G., Kim, J.I., and Seo, J.S. (2000). Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* 275, 25665-25671.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.

Li, J., Brieher, W.M., Scimone, M.L., Kang, S.J., Zhu, H., Yin, H., von Andrian, U.H., Mitchison, T., and Yuan, J. (2007). Caspase-11 regulates cell migration by promoting Aip1-Cofilin-mediated actin depolymerization. *Nat Cell Biol* 9, 276-286.

Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.

Li, Z., Godinho, F.J., Klusmann, J.H., Garriga-Canut, M., Yu, C., and Orkin, S.H. (2005). Developmental stage-selective effect of somatically mutated leukemogenic transcription factor GATA1. *Nat Genet* 37, 613-619.

Liao, W., Li, X., Mancini, M., and Chan, L. (2006). Proteasome inhibition induces differential heat shock protein response but not unfolded protein response in HepG2 cells. *J Cell Biochem* 99, 1085-1095.

Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55, 1151-1191.

Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., *et al.* (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 6, 1389-1399.

Liossis, S.N., Ding, X.Z., Kiang, J.G., and Tsokos, G.C. (1997). Overexpression of the heat shock protein 70 enhances the TCR/CD3- and Fas/Apo-1/CD95-mediated apoptotic cell death in Jurkat T cells. *J Immunol* 158, 5668-5675.

Liston, P., Fong, W.G., and Korneluk, R.G. (2003). The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* 22, 8568-8580.

Liu, Q.L., Kishi, H., Ohtsuka, K., and Muraguchi, A. (2003). Heat shock protein 70 binds caspase-activated DNase and enhances its activity in TCR-stimulated T cells. *Blood* 102, 1788-1796.

Liu, W.H., Lin, Y.L., Wang, J.P., Liou, W., Hou, R.F., Wu, Y.C., and Liao, C.L. (2006a). Restriction of vaccinia virus replication by a ced-3 and ced-4-dependent pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4174-4179.

Liu, Y., Pop, R., Sadegh, C., Brugnara, C., Haase, V.H., and Socolovsky, M. (2006b). Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood* 108, 123-133.

Livnah, O., Stura, E.A., Johnson, D.L., Middleton, S.A., Mulcahy, L.S., Wrighton, N.C., Dower, W.J., Jolliffe, L.K., and Wilson, I.A. (1996). Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: the EPO receptor complex at 2.8 Å. *Science* 273, 464-471.

Lockshin, R.A., and Zakeri, Z. (2001). Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 545-550.

Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.

Lu, X., Levine, R., Tong, W., Wernig, G., Pikman, Y., Zarnegar, S., Gilliland, D.G., and Lodish, H. (2005). Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18962-18967.

Lugus, J.J., Chung, Y.S., Mills, J.C., Kim, S.I., Grass, J., Kyba, M., Doherty, J.M., Bresnick, E.H., and Choi, K. (2007). GATA2 functions at multiple steps in hemangioblast development and differentiation. *Development* 134, 393-405.

Lui, J.C., and Kong, S.K. (2006). Erythropoietin activates caspase-3 and downregulates CAD during erythroid differentiation in TF-1 cells - a protection mechanism against DNA fragmentation. *FEBS Lett* 580, 1965-1970.

Lui, J.C., and Kong, S.K. (2007). Heat shock protein 70 inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor to avoid DNA fragmentation in TF-1 cells during erythropoiesis. *FEBS Lett* 581, 109-117.

Lund, L.R., Romer, J., Thomasset, N., Solberg, H., Pyke, C., Bissell, M.J., Dano, K., and Werb, Z. (1996). Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. *Development* 122, 181-193.

Luthi, A.U., and Martin, S.J. (2007). The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* 14, 641-650.

Majumdar, M.K., Feng, L., Medlock, E., Toksoz, D., and Williams, D.A. (1994). Identification and mutation of primary and secondary proteolytic cleavage sites in murine stem cell factor cDNA yields biologically active, cell-associated protein. *J Biol Chem* 269, 1237-1242.

Malgor, L.A., Valsecia, M., Verges, E., and De Markowsky, E.E. (1998). Blockade of the in vitro effects of testosterone and erythropoietin on Cfu-E and Bfu-E proliferation by pretreatment of the donor rats with cyproterone and flutamide. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 48, 99-105.

Mandal, D., Baudin-Creuza, V., Bhattacharyya, A., Pathak, S., Delaunay, J., Kundu, M., and Basu, J. (2003). Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3). *J Biol Chem* 278, 52551-52558.

Mandal, D., Mazumder, A., Das, P., Kundu, M., and Basu, J. (2005). Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem* 280, 39460-39467.

Mandal, D., Moitra, P.K., Saha, S., and Basu, J. (2002). Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Lett* 513, 184-188.

Marin, M., Karis, A., Visser, P., Grosveld, F., and Philipsen, S. (1997). Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* 89, 619-628.

Marine, J.C., McKay, C., Wang, D., Topham, D.J., Parganas, E., Nakajima, H., Pendeville, H., Yasukawa, H., Sasaki, A., Yoshimura, A., *et al.* (1999). SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. *Cell* 98, 617-627.

Marsden, V.S., Ekert, P.G., Van Delft, M., Vaux, D.L., Adams, J.M., and Strasser, A. (2004). Bcl-2-regulated apoptosis and cytochrome c release can occur independently of both caspase-2 and caspase-9. *J Cell Biol* 165, 775-780.

Marsden, V.S., O'Connor, L., O'Reilly, L.A., Silke, J., Metcalf, D., Ekert, P.G., Huang, D.C., Cecconi, F., Kuida, K., Tomaselli, K.J., *et al.* (2002). Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* 419, 634-637.

Marsters, S.A., Sheridan, J.P., Pitti, R.M., Brush, J., Goddard, A., and Ashkenazi, A. (1998). Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. *Curr Biol* 8, 525-528.

Martinon, F., Hofmann, K., and Tschopp, J. (2001). The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation. *Curr Biol* 11, R118-120.

Martinon, F., and Tschopp, J. (2004). Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 117, 561-574.

Martinvalet, D., Zhu, P., and Lieberman, J. (2005). Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22, 355-370.

Martowicz, M.L., Grass, J.A., Boyer, M.E., Guend, H., and Bresnick, E.H. (2005). Dynamic GATA factor interplay at a multicomponent regulatory region of the GATA-2 locus. *J Biol Chem* 280, 1724-1732.

Masuda, S., Nagao, M., and Sasaki, R. (1999). Erythropoietic, neurotrophic, and angiogenic functions of erythropoietin and regulation of erythropoietin production. *Int J Hematol* 70, 1-6.

Mathias, L.A., Fisher, T.C., Zeng, L., Meiselman, H.J., Weinberg, K.I., Hiti, A.L., and Malik, P. (2000). Ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia major is due to apoptosis at the polychromatophilic normoblast stage. *Exp Hematol* 28, 1343-1353.

Matsumori, Y., Hong, S.M., Aoyama, K., Fan, Y., Kayama, T., Sheldon, R.A., Vexler, Z.S., Ferriero, D.M., Weinstein, P.R., and Liu, J. (2005). Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 899-910.

Maxwell, P.H., Ferguson, D.J., Osmond, M.K., Pugh, C.W., Heryet, A., Doe, B.G., Johnson, M.H., and Ratcliffe, P.J. (1994). Expression of a homologously recombined erythropoietin-SV40 T antigen fusion gene in mouse liver: evidence for erythropoietin production by Ito cells. *Blood* 84, 1823-1830.

Maxwell, P.H., Osmond, M.K., Pugh, C.W., Heryet, A., Nicholls, L.G., Tan, C.C., Doe, B.G., Ferguson, D.J., Johnson, M.H., and Ratcliffe, P.J. (1993). Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int* 44, 1149-1162.

Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., and Ratcliffe, P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271-275.

Mayer, M.P., and Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62, 670-684.

Mayr, B., and Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 599-609.

Means, R.T., Jr., Dessypris, E.N., and Krantz, S.B. (1990). Inhibition of human colony-forming-unit erythroid by tumor necrosis factor requires accessory cells. *J Clin Invest* 86, 538-541.

Means, R.T., Jr., Krantz, S.B., Luna, J., Marsters, S.A., and Ashkenazi, A. (1994). Inhibition of murine erythroid colony formation in vitro by interferon gamma and correction by interferon receptor immunoadhesin. *Blood* 83, 911-915.

Mehaffey, M.G., Newton, A.L., Gandhi, M.J., Crossley, M., and Drachman, J.G. (2001). X-linked thrombocytopenia caused by a novel mutation of GATA-1. *Blood* 98, 2681-2688.

Menon, M.P., Karur, V., Bogacheva, O., Bogachev, O., Cuetara, B., and Wojchowski, D.M. (2006). Signals for stress erythropoiesis are integrated via an erythropoietin receptor-phosphotyrosine-343-Stat5 axis. *J Clin Invest* 116, 683-694.

Meriin, A.B., Yaglom, J.A., Gabai, V.L., Zon, L., Ganiatsas, S., Mosser, D.D., Zon, L., and Sherman, M.Y. (1999). Protein-damaging stresses activate c-Jun N-terminal kinase via inhibition of its dephosphorylation: a novel pathway controlled by HSP72. *Mol Cell Biol* 19, 2547-2555.

Merika, M., and Orkin, S.H. (1995). Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol Cell Biol* 15, 2437-2447.

Metcalf, D., Alexander, W.S., Elefanty, A.G., Nicola, N.A., Hilton, D.J., Starr, R., Mifsud, S., and Di Rago, L. (1999). Aberrant hematopoiesis in mice with inactivation of the gene encoding SOCS-1. *Leukemia* 13, 926-934.

Metcalf, D., and Merchav, S. (1982). Effects of GM-CSF deprivation on precursors of granulocytes and macrophages. *J Cell Physiol* 112, 411-418.

Meyer, L., Deau, B., Forejtnikova, H., Dumenil, D., Margottin-Goguet, F., Lacombe, C., Mayeux, P., and Verdier, F. (2007). beta-Trcp mediates ubiquitination and degradation of the erythropoietin receptor and controls cell proliferation. *Blood* 109, 5215-5222.

Mezger, V., Rallu, M., Morimoto, R.I., Morange, M., and Renard, J.P. (1994). Heat shock factor 2-like activity in mouse blastocysts. *Dev Biol* 166, 819-822.

Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D.W., Briand, C., and Grutter, M.G. (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 277, 45162-45171.

Mikhailov, V., Mikhailova, M., Degenhardt, K., Venkatachalam, M.A., White, E., and Saikumar, P. (2003). Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release. *J Biol Chem* 278, 5367-5376.

Milan, M., Campuzano, S., and Garcia-Bellido, A. (1997). Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5691-5696.

Miller, B.A., Barber, D.L., Bell, L.L., Beattie, B.K., Zhang, M.Y., Neel, B.G., Yoakim, M., Rothblum, L.I., and Cheung, J.Y. (1999a). Identification of the erythropoietin receptor domain required for calcium channel activation. *J Biol Chem* 274, 20465-20472.

Miller, C.P., Heilman, D.W., and Wojchowski, D.M. (2002). Erythropoietin receptor-dependent erythroid colony-forming unit development: capacities of Y343 and phosphotyrosine-null receptor forms. *Blood* 99, 898-904.

Miller, C.P., Liu, Z.Y., Noguchi, C.T., and Wojchowski, D.M. (1999b). A minimal cytoplasmic subdomain of the erythropoietin receptor mediates erythroid and megakaryocytic cell development. *Blood* 94, 3381-3387.

Miller, I.J., and Bieker, J.J. (1993). A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol* 13, 2776-2786.

Miller, K.L., Carlino, J.A., Ogawa, Y., Avis, P.D., and Carroll, K.G. (1992). Alterations in erythropoiesis in TGF-beta 1-treated mice. *Exp Hematol* 20, 951-956.

Miller, L.K. (1999). An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol* 9, 323-328.

Millot, G.A., Svinarchuk, F., Lacout, C., Vainchenker, W., and Dumenil, D. (2001). The granulocyte colony-stimulating factor receptor supports erythroid differentiation in the absence of the erythropoietin receptor or Stat5. *Br J Haematol* 112, 449-458.

Mills, J.C., Stone, N.L., and Pittman, R.N. (1999). Extranuclear apoptosis. The role of the cytoplasm in the execution phase. *J Cell Biol* 146, 703-708.

Miossec, C., Dutilleul, V., Fassy, F., and Diu-Hercend, A. (1997). Evidence for CPP32 activation in the absence of apoptosis during T lymphocyte stimulation. *J Biol Chem* 272, 13459-13462.

Mirandola, P., Gobbi, G., Ponti, C., Sponzilli, I., Cocco, L., and Vitale, M. (2006). PKCepsilon controls protection against TRAIL in erythroid progenitors. *Blood* 107, 508-513.

Mittelman, M., Zeidman, A., Kanter, P., Katz, O., Oster, H., Rund, D., and Neumann, D. (2004). Erythropoietin has an anti-myeloma effect - a hypothesis based on a clinical observation supported by animal studies. *Eur J Haematol* 72, 155-165.

Miura, M., Chen, X.D., Allen, M.R., Bi, Y., Gronthos, S., Seo, B.M., Lakhani, S., Flavell, R.A., Feng, X.H., Robey, P.G., *et al.* (2004). A crucial role of caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 114, 1704-1713.

Miura, O., Nakamura, N., Ihle, J.N., and Aoki, N. (1994a). Erythropoietin-dependent association of phosphatidylinositol 3-kinase with tyrosine-phosphorylated erythropoietin receptor. *J Biol Chem* 269, 614-620.

Miura, Y., Miura, O., Ihle, J.N., and Aoki, N. (1994b). Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the erythropoietin receptor. *J Biol Chem* 269, 29962-29969.

Miyake, T., Kung, C.K., and Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 252, 5558-5564.

Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhi, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* 152, 657-668.

Mogi, M., and Togari, A. (2003). Activation of caspases is required for osteoblastic differentiation. *J Biol Chem* 278, 47477-47482.

Moilanen, L.H., Fukushige, T., and Freedman, J.H. (1999). Regulation of metallothionein gene transcription. Identification of upstream regulatory elements and transcription factors responsible for cell-specific expression of the metallothionein genes from *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 274, 29655-29665.

Moldawer, L.L., Marano, M.A., Wei, H., Fong, Y., Silen, M.L., Kuo, G., Manogue, K.R., Vlassara, H., Cohen, H., Cerami, A., *et al.* (1989). Cachectin/tumor necrosis factor- α alters red blood cell kinetics and induces anemia in vivo. *Faseb J* 3, 1637-1643.

Morano, K.A., and Thiele, D.J. (1999). Heat shock factor function and regulation in response to cellular stress, growth, and differentiation signals. *Gene Expr* 7, 271-282.

Mori, M., Uchida, M., Watanabe, T., Kirito, K., Hatake, K., Ozawa, K., and Komatsu, N. (2003). Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-xL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling. *J Cell Physiol* 195, 290-297.

Morimoto, R., and Fodor, E. (1984). Cell-specific expression of heat shock proteins in chicken reticulocytes and lymphocytes. *J Cell Biol* 99, 1316-1323.

Morimoto, R.I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 12, 3788-3796.

Morioka, K., Tone, S., Mukaida, M., and Takano-Ohmuro, H. (1998). The apoptotic and nonapoptotic nature of the terminal differentiation of erythroid cells. *Exp Cell Res* 240, 206-217.

Morshauser, R.C., Wang, H., Flynn, G.C., and Zinderweg, E.R. (1995). The peptide-binding domain of the chaperone protein Hsc70 has an unusual secondary structure topology. *Biochemistry* 34, 6261-6266.

Mortimore, G.E., Lardeux, B.R., and Heydrick, S.J. (1989). Mechanism and control of protein and RNA degradation in the rat hepatocyte: two modes of autophagic sequestration. *Revis Biol Celular* 20, 79-96.

Mortimore, G.E., Miotto, G., Venerando, R., and Kadowaki, M. (1996). Autophagy. *Subcell Biochem* 27, 93-135.

Mosser, D.D., Caron, A.W., Bourget, L., Meriin, A.B., Sherman, M.Y., Morimoto, R.I., and Massie, B. (2000). The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 20, 7146-7159.

Mosser, D.D., Theodorakis, N.G., and Morimoto, R.I. (1988). Coordinate changes in heat shock element-binding activity and HSP70 gene transcription rates in human cells. *Mol Cell Biol* 8, 4736-4744.

Motoyama, N., Kimura, T., Takahashi, T., Watanabe, T., and Nakano, T. (1999). bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *J Exp Med* 189, 1691-1698.

Mouthon, M.A., Bernard, O., Mitjavila, M.T., Romeo, P.H., Vainchenker, W., and Mathieu-Mahul, D. (1993). Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. *Blood* 81, 647-655.

Mrug, M., Julian, B.A., and Prchal, J.T. (2004). Angiotensin II receptor type 1 expression in erythroid progenitors: Implications for the pathogenesis of postrenal transplant erythrocytosis. *Semin Nephrol* 24, 120-130.

Mrug, M., Stopka, T., Julian, B.A., Prchal, J.F., and Prchal, J.T. (1997). Angiotensin II stimulates proliferation of normal early erythroid progenitors. *J Clin Invest* 100, 2310-2314.

Mufti, G.J., and Galton, D.A. (1986). Myelodysplastic syndromes: natural history and features of prognostic importance. *Clin Haematol* 15, 953-971.

Munugalavadla, V., and Kapur, R. (2005). Role of c-Kit and erythropoietin receptor in erythropoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 54, 63-75.

Murphy, S.P., Gorzowski, J.J., Sarge, K.D., and Phillips, B. (1994). Characterization of constitutive HSF2 DNA-binding activity in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 14, 5309-5317.

Muta, K., and Krantz, S.B. (1993). Apoptosis of human erythroid colony-forming cells is decreased by stem cell factor and insulin-like growth factor I as well as erythropoietin. *J Cell Physiol* 156, 264-271.

Muta, K., Krantz, S.B., Bondurant, M.C., and Dai, C.H. (1995). Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. *Blood* 86, 572-580.

Muta, K., Krantz, S.B., Bondurant, M.C., and Wickrema, A. (1994). Distinct roles of erythropoietin, insulin-like growth factor I, and stem cell factor in the development of erythroid progenitor cells. *J Clin Invest* 94, 34-43.

Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., *et al.* (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.

Myklebust, J.H., Blomhoff, H.K., Rusten, L.S., Stokke, T., and Smeland, E.B. (2002). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 30, 990-1000.

Myssina, S., Huber, S.M., Birka, C., Lang, P.A., Lang, K.S., Friedrich, B., Risler, T., Wieder, T., and Lang, F. (2003). Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin. *J Am Soc Nephrol* 14, 2750-2757.

Nagai, T., Harigae, H., Ishihara, H., Motohashi, H., Minegishi, N., Tsuchiya, S., Hayashi, N., Gu, L., Andres, B., Engel, J.D., *et al.* (1994). Transcription factor GATA-2 is expressed in erythroid, early myeloid, and CD34+ human leukemia-derived cell lines. *Blood* 84, 1074-1084.

Nagata, Y., Takahashi, N., Davis, R.J., and Todokoro, K. (1998). Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood* 92, 1859-1869.

Naka, T., Matsumoto, T., Narazaki, M., Fujimoto, M., Morita, Y., Ohsawa, Y., Saito, H., Nagasawa, T., Uchiyama, Y., and Kishimoto, T. (1998). Accelerated apoptosis of lymphocytes by augmented induction of Bax in SSI-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1) deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15577-15582.

Nakagawa, T., and Yuan, J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150, 887-894.

Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., and Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103.

Nakai, A., Tanabe, M., Kawazoe, Y., Inazawa, J., Morimoto, R.I., and Nagata, K. (1997). HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *Mol Cell Biol* 17, 469-481.

Nakamura, Y., Komatsu, N., and Nakauchi, H. (1992). A truncated erythropoietin receptor that fails to prevent programmed cell death of erythroid cells. *Science* 257, 1138-1141.

Nakao, K., Shirakura, T., Azuma, M., and Maekawa, T. (1967). Studies on erythropoietic action of angiotensin II. *Blood* 29, 754-760.

Navas, T.A., Mohindru, M., Estes, M., Ma, J.Y., Sokol, L., Pahanish, P., Parmar, S., Haghnazari, E., Zhou, L., Collins, R., *et al.* (2006). Inhibition of overactivated p38 MAPK can restore hematopoiesis in myelodysplastic syndrome progenitors. *Blood* 108, 4170-4177.

Nechushtan, A., Smith, C.L., Lamensdorf, I., Yoon, S.H., and Youle, R.J. (2001). Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol* 153, 1265-1276.

Negoro, S., Oh, H., Tone, E., Kunisada, K., Fujio, Y., Walsh, K., Kishimoto, T., and Yamauchi-Takahara, K. (2001). Glycoprotein 130 regulates cardiac myocyte survival in doxorubicin-induced apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt phosphorylation and Bcl-xL/caspase-3 interaction. *Circulation* 103, 555-561.

Netea, M.G., Lewis, E.C., Azam, T., Joosten, L.A., Jaekal, J., Bae, S.Y., Dinarello, C.A., and Kim, S.H. (2008). Interleukin-32 induces the differentiation of monocytes into macrophage-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3515-3520.

Neubauer, H., Cumano, A., Muller, M., Wu, H., Huffstadt, U., and Pfeffer, K. (1998). Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 93, 397-409.

Nichols, K.E., Crispino, J.D., Poncz, M., White, J.G., Orkin, S.H., Maris, J.M., and Weiss, M.J. (2000). Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet* 24, 266-270.

Nicholson, D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6, 1028-1042.

Nicholson, K.M., and Anderson, N.G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14, 381-395.

Nijhawan, D., Fang, M., Traer, E., Zhong, Q., Gao, W., Du, F., and Wang, X. (2003). Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 17, 1475-1486.

Nijhawan, D., Honarpour, N., and Wang, X. (2000). Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci* 23, 73-87.

Nilson, D.G., Sabatino, D.E., Bodine, D.M., and Gallagher, P.G. (2006). Major erythrocyte membrane protein genes in EKLF-deficient mice. *Exp Hematol* 34, 705-712.

Nobuhisa, I., Takizawa, M., Takaki, S., Inoue, H., Okita, K., Ueno, M., Takatsu, K., and Taga, T. (2003). Regulation of hematopoietic development in the aorta-gonad-mesonephros region mediated by Lnk adaptor protein. *Mol Cell Biol* 23, 8486-8494.

Nollen, E.A., Brunsting, J.F., Roelofsen, H., Weber, L.A., and Kampinga, H.H. (1999). In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol Cell Biol* 19, 2069-2079.

Nover, L., Scharf, K.D., Gagliardi, D., Vergne, P., Czarnecka-Verner, E., and Gurley, W.B. (1996). The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription factors. *Cell Stress Chaperones* 1, 215-223.

Nuez, B., Michalovich, D., Bygrave, A., Ploemacher, R., and Grosveld, F. (1995). Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature* 375, 316-318.

Nutt, L.K., Margolis, S.S., Jensen, M., Herman, C.E., Dunphy, W.G., Rathmell, J.C., and Kornbluth, S. (2005). Metabolic regulation of oocyte cell death through the CaMKII-mediated phosphorylation of caspase-2. *Cell* 123, 89-103.

Nylandsted, J., Gyrd-Hansen, M., Danielewicz, A., Fehrenbacher, N., Lademann, U., Hoyer-Hansen, M., Weber, E., Multhoff, G., Rohde, M., and Jaattela, M. (2004). Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J Exp Med* 200, 425-435.

O'Reilly, L.A., Divisekera, U., Newton, K., Scalzo, K., Kataoka, T., Puthalakath, H., Ito, M., Huang, D.C., and Strasser, A. (2004). Modifications and intracellular trafficking of FADD/MORT1 and caspase-8 after stimulation of T lymphocytes. *Cell Death Differ* 11, 724-736.

Ogilvy, S., Metcalf, D., Print, C.G., Bath, M.L., Harris, A.W., and Adams, J.M. (1999). Constitutive Bcl-2 expression throughout the hematopoietic compartment affects multiple lineages and enhances progenitor cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14943-14948.

Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H., and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959.

Oh, I.H., and Reddy, E.P. (1999). The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene* 18, 3017-3033.

Ohneda, K., and Yamamoto, M. (2002). Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. *Acta Haematol* 108, 237-245.

Ohtsuka, R., Abe, Y., Fujii, T., Yamamoto, M., Nishimura, J., Takayanagi, R., and Muta, K. (2007). Mortalin is a novel mediator of erythropoietin signaling. *Eur J Haematol* 79, 114-125.

Okada, H., Bakal, C., Shahinian, A., Elia, A., Wakeham, A., Suh, W.K., Duncan, G.S., Ciofani, M., Rottapel, R., Zuniga-Pflucker, J.C., *et al.* (2004). Survivin loss in thymocytes triggers p53-mediated growth arrest and p53-independent cell death. *J Exp Med* 199, 399-410.

Okumura, N., Tsuji, K., and Nakahata, T. (1992). Changes in cell surface antigen expressions during proliferation and differentiation of human erythroid progenitors. *Blood* 80, 642-650.

Okuyama, R., Nguyen, B.C., Talora, C., Ogawa, E., Tommasi di Vignano, A., Lioumi, M., Chiorino, G., Tagami, H., Woo, M., and Dotto, G.P. (2004). High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism. *Dev Cell* 6, 551-562.

Oomman, S., Strahlendorf, H., Finckbone, V., and Strahlendorf, J. (2005). Non-lethal active caspase-3 expression in Bergmann glia of postnatal rat cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 160, 130-145.

Opferman, J.T., and Korsmeyer, S.J. (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* 4, 410-415.

Opferman, J.T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M.D., Ong, C.C., and Korsmeyer, S.J. (2003). Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* *426*, 671-676.

Orkin, S.H. (1992). GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* *80*, 575-581.

Orkin, S.H. (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* *1*, 57-64.

Orkin, S.H., Kazazian, H.H., Jr., Antonarakis, S.E., Goff, S.C., Boehm, C.D., Sexton, J.P., Waber, P.G., and Giardina, P.J. (1982). Linkage of beta-thalassaemia mutations and beta-globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human beta-globin gene cluster. *Nature* *296*, 627-631.

Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* *132*, 631-644.

Orrenius, S. (2004). Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol Lett* *149*, 19-23.

Osada, H., Grutz, G., Axelson, H., Forster, A., and Rabbitts, T.H. (1995). Association of erythroid transcription factors: complexes involving the LIM protein RBTN2 and the zinc-finger protein GATA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 9585-9589.

Osawa, M., Yamaguchi, T., Nakamura, Y., Kaneko, S., Onodera, M., Sawada, K., Jegalian, A., Wu, H., Nakauchi, H., and Iwama, A. (2002). Erythroid expansion mediated by the Gfi-1B zinc finger protein: role in normal hematopoiesis. *Blood* *100*, 2769-2777.

Osborne, B.A. (1996). Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system. *Curr Opin Immunol* *8*, 245-254.

Ozawa, T. (1995). Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochim Biophys Acta* *1271*, 177-189.

Pace, B.S., Qian, X.H., Sangerman, J., Ofori-Acquah, S.F., Baliga, B.S., Han, J., and Critz, S.D. (2003). p38 MAP kinase activation mediates gamma-globin gene induction in erythroid progenitors. *Exp Hematol* *31*, 1089-1096.

Paddy, M.R., Belmont, A.S., Saumweber, H., Agard, D.A., and Sedat, J.W. (1990). Interphase nuclear envelope lamins form a discontinuous network that interacts with only a fraction of the chromatin in the nuclear periphery. *Cell* *62*, 89-106.

Pahl, H.L. (2000). Towards a molecular understanding of polycythemia rubra vera. *Eur J Biochem* *267*, 3395-3401.

Pal, S., Cantor, A.B., Johnson, K.D., Moran, T.B., Boyer, M.E., Orkin, S.H., and Bresnick, E.H. (2004). Coregulator-dependent facilitation of chromatin occupancy by GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 980-985.

Pan, X., Ohneda, O., Ohneda, K., Lindeboom, F., Iwata, F., Shimizu, R., Nagano, M., Suwabe, N., Philipsen, S., Lim, K.C., *et al.* (2005). Graded levels of GATA-1 expression modulate survival, proliferation, and differentiation of erythroid progenitors. *J Biol Chem* *280*, 22385-22394.

Pang, Q., Christianson, T.A., Keeble, W., Koretsky, T., and Bagby, G.C. (2002). The anti-apoptotic function of Hsp70 in the interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase-mediated death signaling pathway requires the Fanconi anemia protein, FANCC. *J Biol Chem* *277*, 49638-49643.

Pang, Q., Keeble, W., Christianson, T.A., Faulkner, G.R., and Bagby, G.C. (2001). FANCC interacts with Hsp70 to protect hematopoietic cells from IFN-gamma/TNF-alpha-mediated cytotoxicity. *Embo J* *20*, 4478-4489.

Pant, H.C., Virmani, M., and Gallant, P.E. (1983). Calcium-induced proteolysis of spectrin and band 3 protein in rat erythrocyte membranes. *Biochem Biophys Res Commun* *117*, 372-377.

Papayannopoulou, T., Nakamoto, B., Kurachi, S., Tweeddale, M., and Messner, H. (1988). Surface antigenic profile and globin phenotype of two new human erythroleukemia lines: characterization and interpretations. *Blood* 72, 1029-1038.

Pardo, J., Bosque, A., Brehm, R., Wallich, R., Naval, J., Mullbacher, A., Anel, A., and Simon, M.M. (2004). Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J Cell Biol* 167, 457-468.

Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D.J., Marine, J.C., Teglund, S., Vanin, E.F., Bodner, S., Colamonici, O.R., van Deursen, J.M., *et al.* (1998). Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 93, 385-395.

Park, H.S., Cho, S.G., Kim, C.K., Hwang, H.S., Noh, K.T., Kim, M.S., Huh, S.H., Kim, M.J., Ryoo, K., Kim, E.K., *et al.* (2002). Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 22, 7721-7730.

Park, H.S., Lee, J.S., Huh, S.H., Seo, J.S., and Choi, E.J. (2001). Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *Embo J* 20, 446-456.

Parsell, D.A., and Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27, 437-496.

Paw, B.H., Davidson, A.J., Zhou, Y., Li, R., Pratt, S.J., Lee, C., Trede, N.S., Brownlie, A., Donovan, A., Liao, E.C., *et al.* (2003). Cell-specific mitotic defect and dyserythropoiesis associated with erythroid band 3 deficiency. *Nat Genet* 34, 59-64.

Pederzoli, M., Kantari, C., Gausson, V., Moriceau, S., and Witko-Sarsat, V. (2005). Proteinase-3 induces procaspase-3 activation in the absence of apoptosis: potential role of this compartmentalized activation of membrane-associated procaspase-3 in neutrophils. *J Immunol* 174, 6381-6390.

Peller, S., Frenkel, J., Lapidot, T., Kahn, J., Rahimi-Levene, N., Yona, R., Nissim, L., Goldfinger, N., Sherman, D.J., and Rotter, V. (2003). The onset of p53-dependent apoptosis plays a role in terminal differentiation of human normoblasts. *Oncogene* 22, 4648-4655.

Percy, M.J., Zhao, Q., Flores, A., Harrison, C., Lappin, T.R., Maxwell, P.H., McMullin, M.F., and Lee, F.S. (2006). A family with erythrocytosis establishes a role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 654-659.

Perkins, A.C., Gaensler, K.M., and Orkin, S.H. (1996). Silencing of human fetal globin expression is impaired in the absence of the adult beta-globin gene activator protein EKLF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12267-12271.

Perkins, A.C., Sharpe, A.H., and Orkin, S.H. (1995). Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature* 375, 318-322.

Perry, J.M., Harandi, O.F., and Paulson, R.F. (2007). BMP4, SCF, and hypoxia cooperatively regulate the expansion of murine stress erythroid progenitors. *Blood* 109, 4494-4502.

Peter, M.E., and Krammer, P.H. (1998). Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* 10, 545-551.

Peter, M.E., and Krammer, P.H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10, 26-35.

Peters, J.M. (1994). Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem Sci* 19, 377-382.

Petrilli, V., Herceg, Z., Hassa, P.O., Patel, N.S., Di Paola, R., Cortes, U., Dugo, L., Filipe, H.M., Thiemermann, C., Hottiger, M.O., *et al.* (2004). Noncleavable poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the inflammation response in mice. *J Clin Invest* 114, 1072-1081.

Pevny, L., Simon, M.C., Robertson, E., Klein, W.H., Tsai, S.F., D'Agati, V., Orkin, S.H., and Costantini, F. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349, 257-260.

Pharr, P.N., Ogawa, M., Hofbauer, A., and Longmore, G.D. (1994). Expression of an activated erythropoietin or a colony-stimulating factor 1 receptor by pluripotent progenitors enhances colony formation but does not induce differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 7482-7486.

Philipsen, S., and Suske, G. (1999). A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res* *27*, 2991-3000.

Pilon, A.M., Nilson, D.G., Zhou, D., Sangerman, J., Townes, T.M., Bodine, D.M., and Gallagher, P.G. (2006). Alterations in expression and chromatin configuration of the alpha hemoglobin-stabilizing protein gene in erythroid Kruppel-like factor-deficient mice. *Mol Cell Biol* *26*, 4368-4377.

Pircher, T.J., Geiger, J.N., Zhang, D., Miller, C.P., Gaines, P., and Wojchowski, D.M. (2001). Integrative signaling by minimal erythropoietin receptor forms and c-Kit. *J Biol Chem* *276*, 8995-9002.

Plenchette, S., Cathelin, S., Rebe, C., Launay, S., Ladoire, S., Sordet, O., Ponnelle, T., Debili, N., Phan, T.H., Padua, R.A., *et al.* (2004). Translocation of the inhibitor of apoptosis protein c-IAP1 from the nucleus to the Golgi in hematopoietic cells undergoing differentiation: a nuclear export signal-mediated event. *Blood* *104*, 2035-2043.

Pocaly, M., Lagarde, V., Etienne, G., Ribeil, J.A., Claverol, S., Bonneau, M., Moreau-Gaudry, F., Guyonnet-Duperat, V., Hermine, O., Melo, J.V., *et al.* (2007). Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* *21*, 93-101.

Polenakovic, M., and Sikole, A. (1996). Is erythropoietin a survival factor for red blood cells? *J Am Soc Nephrol* *7*, 1178-1182.

Popova, E.Y., Krauss, S.W., Short, S.A., Lee, G., Villalobos, J., Etzell, J., Koury, M.J., Ney, P.A., Chasis, J.A., and Grigoryev, S.A. (2009). Chromatin condensation in terminally differentiating mouse erythroblasts does not involve special architectural proteins but depends on histone deacetylation. *Chromosome Res* *17*, 47-64.

Porcher, C., Liao, E.C., Fujiwara, Y., Zon, L.I., and Orkin, S.H. (1999). Specification of hematopoietic and vascular development by the bHLH transcription factor SCL without direct DNA binding. *Development* *126*, 4603-4615.

Porcher, C., Swat, W., Rockwell, K., Fujiwara, Y., Alt, F.W., and Orkin, S.H. (1996). The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* *86*, 47-57.

Porter, A.G., and Janicke, R.U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* *6*, 99-104.

Prchal, J.F., and Axelrad, A.A. (1974). Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N Engl J Med* *290*, 1382.

Qian, S.B., McDonough, H., Boellmann, F., Cyr, D.M., and Patterson, C. (2006). CHIP-mediated stress recovery by sequential ubiquitination of substrates and Hsp70. *Nature* *440*, 551-555.

Rabindran, S.K., Haroun, R.I., Clos, J., Wisniewski, J., and Wu, C. (1993). Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper. *Science* *259*, 230-234.

Radley, J.M., and Scurfield, G. (1980). The mechanism of platelet release. *Blood* *56*, 996-999.

Raich, N., and Romeo, P.H. (1993). Erythroid regulatory elements. *Stem Cells* *11*, 95-104.

Ranger, A.M., Malynn, B.A., and Korsmeyer, S.J. (2001). Mouse models of cell death. *Nat Genet* *28*, 113-118.

Rao, R.V., Castro-Obregon, S., Frankowski, H., Schuler, M., Stoka, V., del Rio, G., Bredesen, D.E., and Ellerby, H.M. (2002). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* *277*, 21836-21842.

Rao, R.V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., and Bredesen, D.E. (2001). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 276, 33869-33874.

Ratajczak, J., Zhang, Q., Pertusini, E., Wojczyk, B.S., Wasik, M.A., and Ratajczak, M.Z. (1998). The role of insulin (INS) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) in regulating human erythropoiesis. Studies in vitro under serum-free conditions--comparison to other cytokines and growth factors. *Leukemia* 12, 371-381.

Rathbun, R.K., Faulkner, G.R., Ostroski, M.H., Christianson, T.A., Hughes, G., Jones, G., Cahn, R., Maziarz, R., Royle, G., Keeble, W., *et al.* (1997). Inactivation of the Fanconi anemia group C gene augments interferon-gamma-induced apoptotic responses in hematopoietic cells. *Blood* 90, 974-985.

Rathmell, W.K., and Chen, S. (2008). VHL inactivation in renal cell carcinoma: implications for diagnosis, prognosis and treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 8, 63-73.

Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S.A., Maisse, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jaattela, M., Penninger, J.M., Garrido, C., *et al.* (2001). Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 3, 839-843.

Ravet, E., Reynaud, D., Titeux, M., Izac, B., Fichelson, S., Romeo, P.H., Dubart-Kupperschmitt, A., and Pflumio, F. (2004). Characterization of DNA-binding-dependent and -independent functions of SCL/TAL1 during human erythropoiesis. *Blood* 103, 3326-3335.

Ray, S., Lu, Y., Kaufmann, S.H., Gustafson, W.C., Karp, J.E., Boldogh, I., Fields, A.P., and Brasier, A.R. (2004). Genomic mechanisms of p210BCR-ABL signaling: induction of heat shock protein 70 through the GATA response element confers resistance to paclitaxel-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279, 35604-35615.

Raza, A., Gezer, S., Mundle, S., Gao, X.Z., Alvi, S., Borok, R., Rifkin, S., Iftikhar, A., Shetty, V., Parcharidou, A., *et al.* (1995). Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 86, 268-276.

Rebe, C., Cathelin, S., Launay, S., Filomenko, R., Prevotat, L., L'Ollivier, C., Gyan, E., Micheau, O., Grant, S., Dubart-Kupperschmitt, A., *et al.* (2007). Caspase-8 prevents sustained activation of NF-kappaB in monocytes undergoing macrophagic differentiation. *Blood* 109, 1442-1450.

Reichardt, H.M., Kaestner, K.H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P., *et al.* (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93, 531-541.

Rell, K., Koziak, K., Jarzyo, I., Lao, M., and Gaciong, Z. (1994). Correction of posttransplant erythrocytosis with enalapril. *Transplantation* 57, 1059-1063.

Renatus, M., Zhou, Q., Stennicke, H.R., Snipas, S.J., Turk, D., Bankston, L.A., Liddington, R.C., and Salvesen, G.S. (2000). Crystal structure of the apoptotic suppressor CrmA in its cleaved form. *Structure* 8, 789-797.

Renahan, A.G., Booth, C., and Potten, C.S. (2001). What is apoptosis, and why is it important? *Bmj* 322, 1536-1538.

Rhodes, J., Hagen, A., Hsu, K., Deng, M., Liu, T.X., Look, A.T., and Kanki, J.P. (2005a). Interplay of pu.1 and gata1 determines myelo-erythroid progenitor cell fate in zebrafish. *Dev Cell* 8, 97-108.

Rhodes, M.M., Kopsombut, P., Bondurant, M.C., Price, J.O., and Koury, M.J. (2005b). Bcl-x(L) prevents apoptosis of late-stage erythroblasts but does not mediate the antiapoptotic effect of erythropoietin. *Blood* 106, 1857-1863.

Rhodes, M.M., Kopsombut, P., Bondurant, M.C., Price, J.O., and Koury, M.J. (2008). Adherence to macrophages in erythroblastic islands enhances erythroblast proliferation and increases erythrocyte production by a different mechanism than erythropoietin. *Blood* 111, 1700-1708.

Ribatti, D., Presta, M., Vacca, A., Ria, R., Giuliani, R., Dell'Era, P., Nico, B., Roncali, L., and Dammacco, F. (1999). Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 93, 2627-2636.

Richmond, T.D., Chohan, M., and Barber, D.L. (2005). Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol* 15, 146-155.

Ritossa, F.M. (1964). Experimental Activation of Specific Loci in Polytene Chromosomes of *Drosophila*. *Exp Cell Res* 35, 601-607.

Rizzo, J.D., Lichtin, A.E., Woolf, S.H., Seidenfeld, J., Bennett, C.L., Cella, D., Djulbegovic, B., Goode, M.J., Jakubowski, A.A., Lee, S.J., *et al.* (2002). Use of epoetin in patients with cancer: evidence-based clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the American Society of Hematology. *J Clin Oncol* 20, 4083-4107.

Roach, H.I., and Clarke, N.M. (2000). Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. *J Bone Joint Surg Br* 82, 601-613.

Robb, L. (2007). Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene* 26, 6715-6723.

Robb, L., Lyons, I., Li, R., Hartley, L., Kontgen, F., Harvey, R.P., Metcalf, D., and Begley, C.G. (1995). Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the *scl* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7075-7079.

Rothe, M., Pan, M.G., Henzel, W.J., Ayres, T.M., and Goeddel, D.V. (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83, 1243-1252.

Rowley, P.T., Farley, B.A., LaBella, S., Giuliano, R., and Leary, J.F. (1992). Single K562 human leukemia cells express and are inducible for both erythroid and megakaryocytic antigens. *Int J Cell Cloning* 10, 232-240.

Roy, C.N., and Andrews, N.C. (2005). Anemia of inflammation: the hepcidin link. *Curr Opin Hematol* 12, 107-111.

Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J* 16, 6914-6925.

Roy, N., Mahadevan, M.S., McLean, M., Shutler, G., Yaraghi, Z., Farahani, R., Baird, S., Besner-Johnston, A., Lefebvre, C., Kang, X., *et al.* (1995). The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 80, 167-178.

Rubio-Moscardo, F., Blesa, D., Mestre, C., Siebert, R., Balasas, T., Benito, A., Rosenwald, A., Climent, J., Martinez, J.I., Schilhabel, M., *et al.* (2005). Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* 106, 3214-3222.

Rubiolo, C., Piazzolla, D., Meissl, K., Beug, H., Huber, J.C., Kolbus, A., and Baccarini, M. (2006). A balance between Raf-1 and Fas expression sets the pace of erythroid differentiation. *Blood* 108, 152-159.

Ruchalski, K., Mao, H., Li, Z., Wang, Z., Gillers, S., Wang, Y., Mosser, D.D., Gabai, V., Schwartz, J.H., and Borkan, S.C. (2006). Distinct hsp70 domains mediate apoptosis-inducing factor release and nuclear accumulation. *J Biol Chem* 281, 7873-7880.

Rudd, C.E. (2001). Lnk adaptor: novel negative regulator of B cell lymphopoiesis. *Sci STKE* 2001, PE1.

Rund, D., and Rachmilewitz, E. (2005). Beta-thalassemia. *N Engl J Med* 353, 1135-1146.

Ruscher, K., Freyer, D., Karsch, M., Isaev, N., Megow, D., Sawitzki, B., Priller, J., Dirnagl, U., and Meisel, A. (2002). Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci* 22, 10291-10301.

Russell, J.H., and Ley, T.J. (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 20, 323-370.

Rylski, M., Welch, J.J., Chen, Y.Y., Letting, D.L., Diehl, J.A., Chodosh, L.A., Blobel, G.A., and Weiss, M.J. (2003). GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation. *Mol Cell Biol* 23, 5031-5042.

Sadahira, Y., Yoshino, T., and Monobe, Y. (1995). Very late activation antigen 4-vascular cell adhesion molecule 1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands. *J Exp Med* 181, 411-415.

Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G., and Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861-2874.

Sahara, S., Aoto, M., Eguchi, Y., Imamoto, N., Yoneda, Y., and Tsujimoto, Y. (1999). Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 401, 168-173.

Saitoh, T., Morimoto, K., Kumagai, T., Tsuboi, I., Aikawa, S., and Horie, T. (1999). Comparison of erythropoietic response to androgen in young and old senescence accelerated mice. *Mech Ageing Dev* 109, 125-139.

Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-99.

Sakahira, H., and Nagata, S. (2002). Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 277, 3364-3370.

Sakanaka, M., Wen, T.C., Matsuda, S., Masuda, S., Morishita, E., Nagao, M., and Sasaki, R. (1998). In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4635-4640.

Saleh, A., Srinivasula, S.M., Balkir, L., Robbins, P.D., and Alnemri, E.S. (2000). Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2, 476-483.

Saleque, S., Cameron, S., and Orkin, S.H. (2002). The zinc-finger proto-oncogene Gfi-1b is essential for development of the erythroid and megakaryocytic lineages. *Genes Dev* 16, 301-306.

Salmena, L., and Hakem, R. (2005). Caspase-8 deficiency in T cells leads to a lethal lymphoinfiltrative immune disorder. *J Exp Med* 202, 727-732.

Salmena, L., Lemmers, B., Hakem, A., Matysiak-Zablocki, E., Murakami, K., Au, P.Y., Berry, D.M., Tamblyn, L., Shehabeldin, A., Migon, E., *et al.* (2003). Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev* 17, 883-895.

Salvesen, G.S., and Duckett, C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 401-410.

Samali, A., Cai, J., Zhivotovsky, B., Jones, D.P., and Orrenius, S. (1999). Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *Embo J* 18, 2040-2048.

Samali, A., Zhivotovsky, B., Jones, D.P., and Orrenius, S. (1998). Detection of pro-caspase-3 in cytosol and mitochondria of various tissues. *FEBS Lett* 431, 167-169.

Sandberg, M.L., Sutton, S.E., Pletcher, M.T., Wiltshire, T., Tarantino, L.M., Hogenesch, J.B., and Cooke, M.P. (2005). c-Myb and p300 regulate hematopoietic stem cell proliferation and differentiation. *Dev Cell* 8, 153-166.

Sandoval, H., Thiagarajan, P., Dasgupta, S.K., Schumacher, A., Prchal, J.T., Chen, M., and Wang, J. (2008). Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* 454, 232-235.

Sankaran, V.G., Orkin, S.H., and Walkley, C.R. (2008). Rb intrinsically promotes erythropoiesis by coupling cell cycle exit with mitochondrial biogenesis. *Genes Dev* 22, 463-475.

Sarge, K.D., Murphy, S.P., and Morimoto, R.I. (1993). Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol Cell Biol* 13, 1392-1407.

Sarge, K.D., Park-Sarge, O.K., Kirby, J.D., Mayo, K.E., and Morimoto, R.I. (1994). Expression of heat shock factor 2 in mouse testis: potential role as a regulator of heat-shock protein gene expression during spermatogenesis. *Biol Reprod* 50, 1334-1343.

Sarna, M.K., Ingley, E., Busfield, S.J., Cull, V.S., Lepere, W., McCarthy, D.J., Wright, M.J., Palmer, G.A., Chappell, D., Sayer, M.S., *et al.* (2003). Differential regulation of SOCS genes in normal and transformed erythroid cells. *Oncogene* 22, 3221-3230.

Sasaki, A., Yasukawa, H., Shouda, T., Kitamura, T., Dikic, I., and Yoshimura, A. (2000). CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem* 275, 29338-29347.

Sasaki, A., Yasukawa, H., Suzuki, A., Kamizono, S., Syoda, T., Kinjyo, I., Sasaki, M., Johnston, J.A., and Yoshimura, A. (1999). Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells* 4, 339-351.

Sathyanarayana, P., Dev, A., Fang, J., Houde, E., Bogacheva, O., Bogachev, O., Menon, M., Browne, S., Pradeep, A., Emerson, C., *et al.* (2008). EPO receptor circuits for primary erythroblast survival. *Blood* 111, 5390-5399.

Sawada, K., Krantz, S.B., Dessypris, E.N., Koury, S.T., and Sawyer, S.T. (1989). Human colony-forming units-erythroid do not require accessory cells, but do require direct interaction with insulin-like growth factor I and/or insulin for erythroid development. *J Clin Invest* 83, 1701-1709.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17, 1675-1687.

Schiller, P., Amin, J., Ananthan, J., Brown, M.E., Scott, W.A., and Voellmy, R. (1988). Cis-acting elements involved in the regulated expression of a human HSP70 gene. *J Mol Biol* 203, 97-105.

Schimmer, A.D. (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* 64, 7183-7190.

Schmidt, U., van den Akker, E., Parren-van Amelsvoort, M., Litos, G., de Bruijn, M., Gutierrez, L., Hendriks, R.W., Ellmeier, W., Lowenberg, B., Beug, H., *et al.* (2004). Btk is required for an efficient response to erythropoietin and for SCF-controlled protection against TRAIL in erythroid progenitors. *J Exp Med* 199, 785-795.

Schmitt, E., Parcellier, A., Gurbuxani, S., Cande, C., Hammann, A., Morales, M.C., Hunt, C.R., Dix, D.J., Kroemer, R.T., Giordanetto, F., *et al.* (2003). Chemosensitization by a non-apoptogenic heat shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant. *Cancer Res* 63, 8233-8240.

Schneider, E., Moreau, G., Arnould, A., Vasseur, F., Khodabaccus, N., Dy, M., and Ezine, S. (1999). Increased fetal and extramedullary hematopoiesis in Fas-deficient C57BL/6-lpr/lpr mice. *Blood* 94, 2613-2621.

Schofield, C.J., and Ratcliffe, P.J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 343-354.

Schooley, J.C., and Mahlmann, L.J. (1972). Erythropoietin production in the anephric rat. I. Relationship between nephrectomy, time of hypoxic exposure, and erythropoietin production. *Blood* 39, 31-38.

Schrier, S.L. (2002). Pathophysiology of thalassemia. *Curr Opin Hematol* 9, 123-126.

Schutte, B., Henfling, M., Kolgen, W., Bouman, M., Meex, S., Leers, M.P., Nap, M., Bjorklund, V., Bjorklund, P., Bjorklund, B., *et al.* (2004). Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp Cell Res* 297, 11-26.

Schweers, R.L., Zhang, J., Randall, M.S., Loyd, M.R., Li, W., Dorsey, F.C., Kundu, M., Opferman, J.T., Cleveland, J.L., Miller, J.L., *et al.* (2007). NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19500-19505.

Secchiero, P., Melloni, E., Heikinheimo, M., Mannisto, S., Di Pietro, R., Iacone, A., and Zauli, G. (2004). TRAIL regulates normal erythroid maturation through an ERK-dependent pathway. *Blood* 103, 517-522.

Sedger, L.M., Glaccum, M.B., Schuh, J.C., Kanaly, S.T., Williamson, E., Kayagaki, N., Yun, T., Smolak, P., Le, T., Goodwin, R., *et al.* (2002). Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. *Eur J Immunol* 32, 2246-2254.

Seglen, P.O., Gordon, P.B., Holen, I., and Hoyvik, H. (1991). Hepatocytic autophagy. *Biomed Biochim Acta* 50, 373-381.

Seidenfeld, J., Piper, M., Flamm, C., Hasselblad, V., Armitage, J.O., Bennett, C.L., Gordon, M.S., Lichtin, A.E., Wade, J.L., 3rd, Woolf, S., *et al.* (2001). Epoetin treatment of anemia associated with cancer therapy: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Natl Cancer Inst* 93, 1204-1214.

Seigneuret, M., and Devaux, P.F. (1984). ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 3751-3755.

Selleri, C., Maciejewski, J.P., Sato, T., and Young, N.S. (1996). Interferon-gamma constitutively expressed in the stromal microenvironment of human marrow cultures mediates potent hematopoietic inhibition. *Blood* 87, 4149-4157.

Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721-732.

Semenza, G.L., Neufeld, M.K., Chi, S.M., and Antonarakis, S.E. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5680-5684.

Semerad, C.L., Poursine-Laurent, J., Liu, F., and Link, D.C. (1999). A role for G-CSF receptor signaling in the regulation of hematopoietic cell function but not lineage commitment or differentiation. *Immunity* 11, 153-161.

Shi, Y. (2002a). Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure* 10, 285-288.

Shi, Y. (2002b). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9, 459-470.

Shi, Y., and Thomas, J.O. (1992). The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol Cell Biol* 12, 2186-2192.

Shimizu, R., Komatsu, N., Nakamura, Y., Nakauchi, H., Nakabeppu, Y., and Miura, Y. (1996). Role of c-jun in the inhibition of erythropoietin receptor-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 222, 1-6.

Shimizu, R., and Yamamoto, M. (2005). Gene expression regulation and domain function of hematopoietic GATA factors. *Semin Cell Dev Biol* 16, 129-136.

Shin, S., Lee, Y., Kim, W., Ko, H., Choi, H., and Kim, K. (2005). Caspase-2 primes cancer cells for TRAIL-mediated apoptosis by processing procaspase-8. *Embo J* 24, 3532-3542.

Shivdasani, R.A., Rosenblatt, M.F., Zucker-Franklin, D., Jackson, C.W., Hunt, P., Saris, C.J., and Orkin, S.H. (1995). Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell* 81, 695-704.

Shresta, S., Graubert, T.A., Thomas, D.A., Raptis, S.Z., and Ley, T.J. (1999). Granzyme A initiates an alternative pathway for granule-mediated apoptosis. *Immunity* 10, 595-605.

Shtilerman, M., Lorimer, G.H., and Englander, S.W. (1999). Chaperonin function: folding by forced unfolding. *Science* 284, 822-825.

Shulga, N., James, P., Craig, E.A., and Goldfarb, D.S. (1999). A nuclear export signal prevents *Saccharomyces cerevisiae* Hsp70 Ssb1p from stimulating nuclear localization signal-directed nuclear transport. *J Biol Chem* 274, 16501-16507.

Silva, M., Richard, C., Benito, A., Sanz, C., Olalla, I., and Fernandez-Luna, J.L. (1998). Expression of Bel-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 338, 564-571.

Silver, D.F., and Piver, M.S. (1999). Effects of recombinant human erythropoietin on the antitumor effect of cisplatin in SCID mice bearing human ovarian cancer: A possible oxygen effect. *Gynecol Oncol* 73, 280-284.

Silvestris, F., Cafforio, P., Tucci, M., and Dammacco, F. (2002). Negative regulation of erythroblast maturation by Fas-L(+)/TRAIL(+) highly malignant plasma cells: a major pathogenetic mechanism of anemia in multiple myeloma. *Blood* 99, 1305-1313.

Simmons, P.J., Masinovsky, B., Longenecker, B.M., Berenson, R., Torok-Storb, B., and Gallatin, W.M. (1992). Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 80, 388-395.

Simpson, C.F., and Kling, J.M. (1967). The mechanism of denucleation in circulating erythroblasts. *J Cell Biol* 35, 237-245.

Singh, M.K., and Yu, J. (1984). Accumulation of a heat shock-like protein during differentiation of human erythroid cell line K562. *Nature* 309, 631-633.

Singleton, B.K., Burton, N.M., Green, C., Brady, R.L., and Anstee, D.J. (2008). Mutations in EKLF/KLF1 form the molecular basis of the rare blood group In(Lu) phenotype. *Blood* 112, 2081-2088.

Siren, A.L., Knerlich, F., Poser, W., Gleiter, C.H., Bruck, W., and Ehrenreich, H. (2001). Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol* 101, 271-276.

Sistonen, L., Sarge, K.D., Phillips, B., Abravaya, K., and Morimoto, R.I. (1992). Activation of heat shock factor 2 during hemin-induced differentiation of human erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol* 12, 4104-4111.

Sivertsen, E.A., Hystad, M.E., Gutzkow, K.B., Dosen, G., Smeland, E.B., Blomhoff, H.K., and Myklebust, J.H. (2006). PI3K/Akt-dependent Epo-induced signalling and target genes in human early erythroid progenitor cells. *Br J Haematol* 135, 117-128.

Slee, E.A., Adrain, C., and Martin, S.J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276, 7320-7326.

Slepenkov, S.V., and Witt, S.N. (2002). The unfolding story of the *Escherichia coli* Hsp70 DnaK: is DnaK a holdase or an unfoldase? *Mol Microbiol* 45, 1197-1206.

Smyth, M.J., Takeda, K., Hayakawa, Y., Peschon, J.J., van den Brink, M.R., and Yagita, H. (2003). Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* 18, 1-6.

Socolovsky, M. (2007). Molecular insights into stress erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 14, 215-224.

Socolovsky, M., Dusanter-Fourt, I., and Lodish, H.F. (1997). The prolactin receptor and severely truncated erythropoietin receptors support differentiation of erythroid progenitors. *J Biol Chem* 272, 14009-14012.

Socolovsky, M., Fallon, A.E., Wang, S., Brugnara, C., and Lodish, H.F. (1999). Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a-/-5b-/- mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 98, 181-191.

Somervaille, T.C., Linch, D.C., and Khwaja, A. (2001). Growth factor withdrawal from primary human erythroid progenitors induces apoptosis through a pathway involving glycogen synthase kinase-3 and Bax. *Blood* 98, 1374-1381.

Song, J., Takeda, M., and Morimoto, R.I. (2001). Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nat Cell Biol* 3, 276-282.

Soni, S., Bala, S., Gwynn, B., Sahr, K.E., Peters, L.L., and Hanspal, M. (2006). Absence of erythroblast macrophage protein (Emp) leads to failure of erythroblast nuclear extrusion. *J Biol Chem* 281, 20181-20189.

Sordet, O., Rebe, C., Dubrez-Daloz, L., Boudard, D., and Solary, E. (2002a). Intracellular redistribution of procaspases during TPA-induced differentiation of U937 human leukemic cells. *Leukemia* 16, 1569-1570.

Sordet, O., Rebe, C., Plenchette, S., Zermati, Y., Hermine, O., Vainchenker, W., Garrido, C., Solary, E., and Dubrez-Daloz, L. (2002b). Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood* 100, 4446-4453.

Sorger, P.K., Lewis, M.J., and Pelham, H.R. (1987). Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells. *Nature* 329, 81-84.

Sperandio, S., de Belle, I., and Bredesen, D.E. (2000). An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14376-14381.

Sprick, M.R., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M.A., and Walczak, H. (2002). Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *Embo J* 21, 4520-4530.

Squier, M.K., Sehnert, A.J., Sellins, K.S., Malkinson, A.M., Takano, E., and Cohen, J.J. (1999). Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis. *J Cell Physiol* 178, 311-319.

Stachura, D.L., Chou, S.T., and Weiss, M.J. (2006). Early block to erythromegakaryocytic development conferred by loss of transcription factor GATA-1. *Blood* 107, 87-97.

Staerk, J., Kallin, A., Demoulin, J.B., Vainchenker, W., and Constantinescu, S.N. (2005). JAK1 and Tyk2 activation by the homologous polycythemia vera JAK2 V617F mutation: cross-talk with IGF1 receptor. *J Biol Chem* 280, 41893-41899.

Stankiewicz, A.R., Lachapelle, G., Foo, C.P., Radicioni, S.M., and Mosser, D.D. (2005). Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* 280, 38729-38739.

Stankiewicz, A.R., Livingstone, A.M., Mohseni, N., and Mosser, D.D. (2009). Regulation of heat-induced apoptosis by Mcl-1 degradation and its inhibition by Hsp70. *Cell Death Differ* 16, 638-647.

Starck, J., Cohet, N., Gonnet, C., Sarrazin, S., Doubeikovskaia, Z., Doubeikovski, A., Verger, A., Duterque-Coquillaud, M., and Morle, F. (2003). Functional cross-antagonism between transcription factors FLI-1 and EKLF. *Mol Cell Biol* 23, 1390-1402.

Starr, R., Willson, T.A., Viney, E.M., Murray, L.J., Rayner, J.R., Jenkins, B.J., Gonda, T.J., Alexander, W.S., Metcalf, D., Nicola, N.A., *et al.* (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387, 917-921.

Steel, R., Doherty, J.P., Buzzard, K., Clemons, N., Hawkins, C.J., and Anderson, R.L. (2004). Hsp72 inhibits apoptosis upstream of the mitochondria and not through interactions with Apaf-1. *J Biol Chem* 279, 51490-51499.

Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267, 1445-1449.

Stennicke, H.R., Ryan, C.A., and Salvesen, G.S. (2002). Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem Sci* 27, 94-101.

Stephen, M.R., and Lindop, G.B. (1998). A renin secreting ovarian steroid cell tumour associated with secondary polycythaemia. *J Clin Pathol* 51, 75-77.

Stuben, G., Thews, O., Pottgen, C., Knuhmann, K., Vaupel, P., and Stuschke, M. (2001). Recombinant human erythropoietin increases the radiosensitivity of xenografted human tumours in anaemic nude mice. *J Cancer Res Clin Oncol* 127, 346-350.

Su, H., Bidere, N., Zheng, L., Cubre, A., Sakai, K., Dale, J., Salmena, L., Hakem, R., Straus, S., and Lenardo, M. (2005). Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science* 307, 1465-1468.

Sui, X., Krantz, S.B., You, M., and Zhao, Z. (1998). Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. *Blood* 92, 1142-1149.

Suliman, A., Lam, A., Datta, R., and Srivastava, R.K. (2001). Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* 20, 2122-2133.

Susin, S.A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Prevost, M.C., *et al.* (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 192, 571-580.

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., *et al.* (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.

Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., and Takahashi, R. (2001). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8662-8667.

Syed, R.S., Reid, S.W., Li, C., Cheetham, J.C., Aoki, K.H., Liu, B., Zhan, H., Osslund, T.D., Chirino, A.J., Zhang, J., *et al.* (1998). Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature* 395, 511-516.

Szilvassy, S.J. (2003). The biology of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 34, 446-460.

Tabilio, A., Rosa, J.P., Testa, U., Kieffer, N., Nurden, A.T., Del Canizo, M.C., Breton-Gorius, J., and Vainchenker, W. (1984). Expression of platelet membrane glycoproteins and alpha-granule proteins by a human erythroleukemia cell line (HEL). *Embo J* 3, 453-459.

Taira, T., Sawai, M., Ikeda, M., Tamai, K., Iguchi-Ariga, S.M., and Ariga, H. (1999). Cell cycle-dependent switch of up-and down-regulation of human hsp70 gene expression by interaction between c-Myc and CBF/NF-Y. *J Biol Chem* 274, 24270-24279.

Takahashi, S., Shimizu, R., Suwabe, N., Kuroha, T., Yoh, K., Ohta, J., Nishimura, S., Lim, K.C., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (2000). GATA factor transgenes under GATA-1 locus control rescue germline GATA-1 mutant deficiencies. *Blood* 96, 910-916.

Takano-Ohmuro, H., Mukaida, M., Kominami, E., and Morioka, K. (2000). Autophagy in embryonic erythroid cells: its role in maturation. *Eur J Cell Biol* 79, 759-764.

Tamura, K., Sudo, T., Senfleben, U., Dadak, A.M., Johnson, R., and Karin, M. (2000). Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell* 102, 221-231.

Tan, B.L., Hong, L., Munugalavadla, V., and Kapur, R. (2003). Functional and biochemical consequences of abrogating the activation of multiple diverse early signaling pathways in Kit. Role for Src kinase pathway in Kit-induced cooperation with erythropoietin receptor. *J Biol Chem* 278, 11686-11695.

Tan, C.C., Eckardt, K.U., and Ratcliffe, P.J. (1991). Organ distribution of erythropoietin messenger RNA in normal and uremic rats. *Kidney Int* 40, 69-76.

Tang, D., and Kidd, V.J. (1998). Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. *J Biol Chem* 273, 28549-28552.

Tavaria, M., Gabriele, T., Kola, I., and Anderson, R.L. (1996). A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* 1, 23-28.

Testa, U. (2004). Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia* 18, 1176-1199.

Tewari, R., Gillemans, N., Wijgerde, M., Nuez, B., von Lindern, M., Grosveld, F., and Philipsen, S. (1998). Erythroid Kruppel-like factor (EKLF) is active in primitive and definitive erythroid cells and is required for the function of 5'HS3 of the beta-globin locus control region. *Embo J* 17, 2334-2341.

Thews, O., Kelleher, D.K., and Vaupel, P. (2001). Erythropoietin restores the anemia-induced reduction in cyclophosphamide cytotoxicity in rat tumors. *Cancer Res* 61, 1358-1361.

Thome, M., and Tschopp, J. (2001). Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol* 1, 50-58.

Thornberry, N.A., and Molineaux, S.M. (1995). Interleukin-1 beta converting enzyme: a novel cysteine protease required for IL-1 beta production and implicated in programmed cell death. *Protein Sci* 4, 3-12.

Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., *et al.* (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17907-17911.

Tilbrook, P.A., Ingley, E., Williams, J.H., Hibbs, M.L., and Klinken, S.P. (1997). Lyn tyrosine kinase is essential for erythropoietin-induced differentiation of J2E erythroid cells. *Embo J* 16, 1610-1619.

Till, J.E., McCulloch, E.A., and Siminovitch, L. (1964). A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, 29-36.

Tilly, J.L., Kowalski, K.I., Johnson, A.L., and Hsueh, A.J. (1991). Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 129, 2799-2801.

Tinel, A., and Tschopp, J. (2004). The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304, 843-846.

Tissieres, A., Mitchell, H.K., and Tracy, U.M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84, 389-398.

Tong, B., Grimes, H.L., Yang, T.Y., Bear, S.E., Qin, Z., Du, K., El-Deiry, W.S., and Tsichlis, P.N. (1998). The Gfi-1B proto-oncoprotein represses p21WAF1 and inhibits myeloid cell differentiation. *Mol Cell Biol* 18, 2462-2473.

Tong, W., and Lodish, H.F. (2004). Lnk inhibits Tpo-mpl signaling and Tpo-mediated megakaryocytopoiesis. *J Exp Med* 200, 569-580.

Tong, W., Zhang, J., and Lodish, H.F. (2005). Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood* 105, 4604-4612.

Trainor, C.D., Omichinski, J.G., Vandergon, T.L., Gronenborn, A.M., Clore, G.M., and Felsenfeld, G. (1996). A palindromic regulatory site within vertebrate GATA-1 promoters

requires both zinc fingers of the GATA-1 DNA-binding domain for high-affinity interaction. *Mol Cell Biol* 16, 2238-2247.

Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2, 735-747.

Tsang, A.P., Fujiwara, Y., Hom, D.B., and Orkin, S.H. (1998). Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev* 12, 1176-1188.

Tsang, A.P., Visvader, J.E., Turner, C.A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M.J., Crossley, M., and Orkin, S.H. (1997). FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* 90, 109-119.

Tschopp, J., Irmeler, M., and Thome, M. (1998). Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* 10, 552-558.

Tsukahara, F., and Maru, Y. (2004). Identification of novel nuclear export and nuclear localization-related signals in human heat shock cognate protein 70. *J Biol Chem* 279, 8867-8872.

Tunstall-Pedoe, O., Roy, A., Karadimitris, A., de la Fuente, J., Fisk, N.M., Bennett, P., Norton, A., Vyas, P., and Roberts, I. (2008). Abnormalities in the myeloid progenitor compartment in Down syndrome fetal liver precede acquisition of GATA1 mutations. *Blood* 112, 4507-4511.

Uddin, S., Ah-Kang, J., Ulaszek, J., Mahmud, D., and Wickrema, A. (2004). Differentiation stage-specific activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 147-152.

Ugo, V., Marzac, C., Teyssandier, I., Larbret, F., Lecluse, Y., Debili, N., Vainchenker, W., and Casadevall, N. (2004). Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol* 32, 179-187.

Ulich, T.R., del Castillo, J., and Yin, S. (1990). Tumor necrosis factor exerts dose-dependent effects on erythropoiesis and myelopoiesis in vivo. *Exp Hematol* 18, 311-315.

Uren, A.G., Coulson, E.J., and Vaux, D.L. (1998). Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts. *Trends Biochem Sci* 23, 159-162.

Vakoc, C.R., Letting, D.L., Gheldof, N., Sawado, T., Bender, M.A., Groudine, M., Weiss, M.J., Dekker, J., and Blobel, G.A. (2005). Proximity among distant regulatory elements at the beta-globin locus requires GATA-1 and FOG-1. *Mol Cell* 17, 453-462.

Van de Craen, M., Declercq, W., Van den brande, I., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1999). The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell Death Differ* 6, 1117-1124.

van den Akker, E., van Dijk, T., Parren-van Amelsvoort, M., Grossmann, K.S., Schaeper, U., Toney-Earley, K., Waltz, S.E., Lowenberg, B., and von Lindern, M. (2004). Tyrosine kinase receptor RON functions downstream of the erythropoietin receptor to induce expansion of erythroid progenitors. *Blood* 103, 4457-4465.

van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S.M., Rodriguez, I., Alnemri, E.S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* 9, 20-26.

Vander Heiden, M.G., and Thompson, C.B. (1999). Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol* 1, E209-216.

Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannilkulchai, N., Beckmann, J.S., Mett, I.L., Rebrikov, D., Brodianski, V.M., Kemper, O.C., Kollet, O., *et al.* (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9, 267-276.

Vasku, A., Soucek, M., Znojil, V., Rihacek, I., Cidl, K., Strelcova, L., and Vacha, J. (1998). Does angiotensin I-converting enzyme inhibitor therapy have an antiproliferative effect on blood-forming bone marrow? *Exp Hematol* 26, 277-279.

Vaux, D.L., Cory, S., and Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-442.

Veis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75, 229-240.

Velazquez, L., Cheng, A.M., Fleming, H.E., Furlonger, C., Vesely, S., Bernstein, A., Paige, C.J., and Pawson, T. (2002). Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in Lnk-deficient mice. *J Exp Med* 195, 1599-1611.

Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1998). Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 187, 1477-1485.

Verdier, F., Walrafen, P., Hubert, N., Chretien, S., Gisselbrecht, S., Lacombe, C., and Mayeux, P. (2000). Proteasomes regulate the duration of erythropoietin receptor activation by controlling down-regulation of cell surface receptors. *J Biol Chem* 275, 18375-18381.

Villa, P., Bigini, P., Mennini, T., Agnello, D., Laragione, T., Cagnotto, A., Viviani, B., Marinovich, M., Cerami, A., Coleman, T.R., *et al.* (2003). Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med* 198, 971-975.

Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501.

von Lindern, M., Zauner, W., Mellitzer, G., Steinlein, P., Fritsch, G., Huber, K., Lowenberg, B., and Beug, H. (1999). The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro. *Blood* 94, 550-559.

Voss, O.H., Batra, S., Kolattukudy, S.J., Gonzalez-Mejia, M.E., Smith, J.B., and Doseff, A.I. (2007). Binding of caspase-3 prodomain to heat shock protein 27 regulates monocyte apoptosis by inhibiting caspase-3 proteolytic activation. *J Biol Chem* 282, 25088-25099.

Vyas, P., Ault, K., Jackson, C.W., Orkin, S.H., and Shivdasani, R.A. (1999a). Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood* 93, 2867-2875.

Vyas, P., McDevitt, M.A., Cantor, A.B., Katz, S.G., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (1999b). Different sequence requirements for expression in erythroid and megakaryocytic cells within a regulatory element upstream of the GATA-1 gene. *Development* 126, 2799-2811.

Wada, S., Hamada, M., and Satoh, N. (2006). A genomewide analysis of genes for the heat shock protein 70 chaperone system in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Cell Stress Chaperones* 11, 23-33.

Wadman, I.A., Osada, H., Grutz, G.G., Agulnick, A.D., Westphal, H., Forster, A., and Rabbitts, T.H. (1997). The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *Embo J* 16, 3145-3157.

Wagner, K.U., Claudio, E., Rucker, E.B., 3rd, Riedlinger, G., Broussard, C., Schwartzberg, P.L., Siebenlist, U., and Hennighausen, L. (2000). Conditional deletion of the Bcl-x gene from erythroid cells results in hemolytic anemia and profound splenomegaly. *Development* 127, 4949-4958.

Wagner, K.W., Engels, I.H., and Deveraux, Q.L. (2004). Caspase-2 can function upstream of bid cleavage in the TRAIL apoptosis pathway. *J Biol Chem* 279, 35047-35052.

Wajant, H. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296, 1635-1636.

Wakao, H., Harada, N., Kitamura, T., Mui, A.L., and Miyajima, A. (1995). Interleukin 2 and erythropoietin activate STAT5/MGF via distinct pathways. *Embo J* 14, 2527-2535.

Walrafen, P., Verdier, F., Kadri, Z., Chretien, S., Lacombe, C., and Mayeux, P. (2005). Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood* 105, 600-608.

Walter, J., Schindzielorz, A., Grunberg, J., and Haass, C. (1999). Phosphorylation of presenilin-2 regulates its cleavage by caspases and retards progression of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1391-1396.

Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5510-5514.

Wang, J., Zheng, L., Lobito, A., Chan, F.K., Dale, J., Sneller, M., Yao, X., Puck, J.M., Straus, S.E., and Lenardo, M.J. (1999). Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 98, 47-58.

Wang, K.K. (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference?, by Kevin K.W. Wang Vol. 23, pp. 20-26. *Trends Neurosci* 23, 59.

Wang, S., Miura, M., Jung, Y.K., Zhu, H., Li, E., and Yuan, J. (1998). Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell* 92, 501-509.

Wang, W., Horner, D.N., Chen, W.L., Zandstra, P.W., and Audet, J. (2008). Synergy between erythropoietin and stem cell factor during erythropoiesis can be quantitatively described without co-signaling effects. *Biotechnol Bioeng* 99, 1261-1272.

Warren, A.J., Colledge, W.H., Carlton, M.B., Evans, M.J., Smith, A.J., and Rabbitts, T.H. (1994). The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell* 78, 45-57.

Weber, C.H., and Vincenz, C. (2001). The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends Biochem Sci* 26, 475-481.

Weber, R. (1964). Ultrastructural Changes in Regressing Tail Muscles of *Xenopus* Larvae at Metamorphosis. *J Cell Biol* 22, 481-487.

Wechsler, J., Greene, M., McDevitt, M.A., Anastasi, J., Karp, J.E., Le Beau, M.M., and Crispino, J.D. (2002). Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet* 32, 148-152.

Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-730.

Weil, M., Raff, M.C., and Braga, V.M. (1999). Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr Biol* 9, 361-364.

Weiss, M.J., and dos Santos, C.O. (2009). Chaperoning erythropoiesis. *Blood* 113, 2136-2144.

Weiss, M.J., Keller, G., and Orkin, S.H. (1994). Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev* 8, 1184-1197.

Wessely, O., Deiner, E.M., Beug, H., and von Lindern, M. (1997). The glucocorticoid receptor is a key regulator of the decision between self-renewal and differentiation in erythroid progenitors. *Embo J* 16, 267-280.

Westwood, J.T., Clos, J., and Wu, C. (1991). Stress-induced oligomerization and chromosomal relocalization of heat-shock factor. *Nature* 353, 822-827.

Wiederrecht, G., Seto, D., and Parker, C.S. (1988). Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor. *Cell* 54, 841-853.

Wijgerde, M., Gribnau, J., Trimborn, T., Nuez, B., Philipsen, S., Grosveld, F., and Fraser, P. (1996). The role of EKLF in human beta-globin gene competition. *Genes Dev* 10, 2894-2902.

Wikstrom, L., Johansson, C., Salto, C., Barlow, C., Campos Barros, A., Baas, F., Forrest, D., Thoren, P., and Vennstrom, B. (1998). Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. *Embo J* 17, 455-461.

Wilhelm, S., Wagner, H., and Hacker, G. (1998). Activation of caspase-3-like enzymes in non-apoptotic T cells. *Eur J Immunol* 28, 891-900.

Winning, R.S., and Browder, L.W. (1988). Changes in heat shock protein synthesis and hsp70 gene transcription during erythropoiesis of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 128, 111-120.

Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Yi, T., Tang, B., Miura, O., and Ihle, J.N. (1993). JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 74, 227-236.

Wognum, A.W., Eaves, A.C., and Thomas, T.E. (2003). Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 34, 461-475.

Wojchowski, D.M., Gregory, R.C., Miller, C.P., Pandit, A.K., and Pircher, T.J. (1999). Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Exp Cell Res* 253, 143-156.

Woo, A.J., Moran, T.B., Schindler, Y.L., Choe, S.K., Langer, N.B., Sullivan, M.R., Fujiwara, Y., Paw, B.H., and Cantor, A.B. (2008). Identification of ZBP-89 as a novel GATA-1-associated transcription factor involved in megakaryocytic and erythroid development. *Mol Cell Biol* 28, 2675-2689.

Woo, M., Hakem, R., Furlonger, C., Hakem, A., Duncan, G.S., Sasaki, T., Bouchard, D., Lu, L., Wu, G.E., Paige, C.J., *et al.* (2003). Caspase-3 regulates cell cycle in B cells: a consequence of substrate specificity. *Nat Immunol* 4, 1016-1022.

Woo, M., Hakem, R., Soengas, M.S., Duncan, G.S., Shahinian, A., Kagi, D., Hakem, A., McCurrach, M., Khoo, W., Kaufman, S.A., *et al.* (1998). Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev* 12, 806-819.

Wood, W., Turmaine, M., Weber, R., Camp, V., Maki, R.A., McKercher, S.R., Martin, P. (2000). Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development* 127, 5245-5252.

Woon, L.A., Holland, J.W., Kable, E.P., and Roufogalis, B.D. (1999). Ca²⁺ sensitivity of phospholipid scrambling in human red cell ghosts. *Cell Calcium* 25, 313-320.

Wu, C. (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 441-469.

Wu, D.M., Zhang, Y., Parada, N.A., Kornfeld, H., Nicoll, J., Center, D.M., and Cruikshank, W.W. (1999a). Processing and release of IL-16 from CD4⁺ but not CD8⁺ T cells is activation dependent. *J Immunol* 162, 1287-1293.

Wu, H., Klingmuller, U., Acurio, A., Hsiao, J.G., and Lodish, H.F. (1997). Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1806-1810.

Wu, H., Klingmuller, U., Besmer, P., and Lodish, H.F. (1995a). Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* 377, 242-246.

Wu, H., Lee, S.H., Gao, J., Liu, X., and Iruela-Arispe, M.L. (1999b). Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* 126, 3597-3605.

Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., and Lodish, H.F. (1995b). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 83, 59-67.

Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., and Greenberg, M.E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331.

Xiao, W., Koizumi, K., Nishio, M., Endo, T., Osawa, M., Fujimoto, K., Sato, I., Sakai, T., Koike, T., and Sawada, K. (2002). Tumor necrosis factor- α inhibits generation of glycophorin A⁺ cells by CD34⁺ cells. *Exp Hematol* 30, 1238-1247.

Xing, Z., Conway, E.M., Kang, C., and Winoto, A. (2004). Essential role of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in T cell development, maturation, and homeostasis. *J Exp Med* 199, 69-80.

Xu, G., Cirilli, M., Huang, Y., Rich, R.L., Myszka, D.G., and Wu, H. (2001). Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/p35 complex. *Nature* 410, 494-497.

Xu, Z., Huang, S., Chang, L.S., Agulnick, A.D., and Brandt, S.J. (2003). Identification of a TAL1 target gene reveals a positive role for the LIM domain-binding protein Ldb1 in erythroid gene expression and differentiation. *Mol Cell Biol* 23, 7585-7599.

Yang, L., Bryder, D., Adolfsson, J., Nygren, J., Mansson, R., Sigvardsson, M., and Jacobsen, S.E. (2005). Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* 105, 2717-2723.

Yang, Y., Li, C.C., and Weissman, A.M. (2004). Regulating the p53 system through ubiquitination. *Oncogene* 23, 2096-2106.

Yasukawa, H., Sasaki, A., and Yoshimura, A. (2000). Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu Rev Immunol* 18, 143-164.

Yeh, W.C., Pompa, J.L., McCurrach, M.E., Shu, H.B., Elia, A.J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., *et al.* (1998). FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 279, 1954-1958.

Yellajoshyula, D., and Brown, D.T. (2006). Global modulation of chromatin dynamics mediated by dephosphorylation of linker histone H1 is necessary for erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18568-18573.

Yi, C.H., and Yuan, J. (2009). The Jekyll and Hyde functions of caspases. *Dev Cell* 16, 21-34.

Yoshida, H., Kawane, K., Koike, M., Mori, Y., Uchiyama, Y., and Nagata, S. (2005). Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature* 437, 754-758.

Yoshimura, A., Ohkubo, T., Kiguchi, T., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Hara, T., and Miyajima, A. (1995). A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *Embo J* 14, 2816-2826.

Yoshimura, A., Zimmers, T., Neumann, D., Longmore, G., Yoshimura, Y., and Lodish, H.F. (1992). Mutations in the Trp-Ser-X-Trp-Ser motif of the erythropoietin receptor abolish processing, ligand binding, and activation of the receptor. *J Biol Chem* 267, 11619-11625.

Young, J.C., Agashe, V.R., Siegers, K., and Hartl, F.U. (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 781-791.

Yu, C., Niakan, K.K., Matsushita, M., Stamatoyannopoulos, G., Orkin, S.H., and Raskind, W.H. (2002a). X-linked thrombocytopenia with thalassemia from a mutation in the amino finger of GATA-1 affecting DNA binding rather than FOG-1 interaction. *Blood* 100, 2040-2045.

Yu, X., Shacka, J.J., Eells, J.B., Suarez-Quian, C., Przygodzki, R.M., Beleslin-Cokic, B., Lin, C.S., Nikodem, V.M., Hempstead, B., Flanders, K.C., *et al.* (2002b). Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development* 129, 505-516.

Yuan, J., Angelucci, E., Lucarelli, G., Aljurf, M., Snyder, L.M., Kiefer, C.R., Ma, L., and Schrier, S.L. (1993a). Accelerated programmed cell death (apoptosis) in erythroid precursors of patients with severe beta-thalassemia (Cooley's anemia). *Blood* 82, 374-377.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. (1993b). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-652.

Zamai, L., Secchiero, P., Pierpaoli, S., Bassini, A., Papa, S., Alnemri, E.S., Guidotti, L., Vitale, M., and Zauli, G. (2000). TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis. *Blood* 95, 3716-3724.

Zang, H., Sato, K., Nakajima, H., McKay, C., Ney, P.A., and Ihle, J.N. (2001). The distal region and receptor tyrosines of the Epo receptor are non-essential for in vivo erythropoiesis. *Embo J* 20, 3156-3166.

Zerafa, N., Westwood, J.A., Cretney, E., Mitchell, S., Waring, P., Iezzi, M., and Smyth, M.J. (2005). Cutting edge: TRAIL deficiency accelerates hematological malignancies. *J Immunol* 175, 5586-5590.

Zermati, Y., Fichelson, S., Valensi, F., Freyssinier, J.M., Rouyer-Fessard, P., Cramer, E., Guichard, J., Varet, B., and Hermine, O. (2000). Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. *Exp Hematol* 28, 885-894.

Zermati, Y., Garrido, C., Amsellem, S., Fishelson, S., Bouscary, D., Valensi, F., Varet, B., Solary, E., and Hermine, O. (2001). Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* 193, 247-254.

Zeuner, A., Eramo, A., Testa, U., Felli, N., Pelosi, E., Mariani, G., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Condorelli, G., Peschle, C., *et al.* (2003a). Control of erythroid cell production via caspase-mediated cleavage of transcription factor SCL/Tal-1. *Cell Death Differ* 10, 905-913.

Zeuner, A., Pedini, F., Signore, M., Ruscio, G., Messina, C., Tafuri, A., Girelli, G., Peschle, C., and De Maria, R. (2006). Increased death receptor resistance and FLIPshort expression in polycythemia vera erythroid precursor cells. *Blood* 107, 3495-3502.

Zeuner, A., Pedini, F., Signore, M., Testa, U., Pelosi, E., Peschle, C., and De Maria, R. (2003b). Stem cell factor protects erythroid precursor cells from chemotherapeutic agents via up-regulation of BCL-2 family proteins. *Blood* 102, 87-93.

Zhang, W., Kadam, S., Emerson, B.M., and Bieker, J.J. (2001). Site-specific acetylation by p300 or CREB binding protein regulates erythroid Kruppel-like factor transcriptional activity via its interaction with the SWI-SNF complex. *Mol Cell Biol* 21, 2413-2422.

Zhao, R., Xing, S., Li, Z., Fu, X., Li, Q., Krantz, S.B., and Zhao, Z.J. (2005). Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem* 280, 22788-22792.

Zhao, W., Kitidis, C., Fleming, M.D., Lodish, H.F., and Ghaffari, S. (2006). Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood* 107, 907-915.

Zheng, J., Kitajima, K., Sakai, E., Kimura, T., Minegishi, N., Yamamoto, M., and Nakano, T. (2006). Differential effects of GATA-1 on proliferation and differentiation of erythroid lineage cells. *Blood* 107, 520-527.

Zheng, T.S., Hunot, S., Kuida, K., and Flavell, R.A. (1999). Caspase knockouts: matters of life and death. *Cell Death Differ* 6, 1043-1053.

Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2005). Caspase-2 function in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 859-867.

Zhong, J.F., Zhao, Y., Sutton, S., Su, A., Zhan, Y., Zhu, L., Yan, C., Gallaher, T., Johnston, P.B., Anderson, W.F., *et al.* (2005). Gene expression profile of murine long-term reconstituting vs. short-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2448-2453.

Zhong, R.K., Astle, C.M., and Harrison, D.E. (1996). Distinct developmental patterns of short-term and long-term functioning lymphoid and myeloid precursors defined by competitive limiting dilution analysis in vivo. *J Immunol* 157, 138-145.

Zhou, D., Pawlik, K.M., Ren, J., Sun, C.W., and Townes, T.M. (2006). Differential binding of erythroid Kruppel-like factor to embryonic/fetal globin gene promoters during development. *J Biol Chem* 281, 16052-16057.

Zhou, P., Qian, L., Bieszczad, C.K., Noelle, R., Binder, M., Levy, N.B., and Craig, R.W. (1998). Mcl-1 in transgenic mice promotes survival in a spectrum of hematopoietic cell types and immortalization in the myeloid lineage. *Blood* 92, 3226-3239.

Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V.M., and Salvesen, G.S. (1997). Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J Biol Chem* 272, 7797-7800.

Zhou, Q., Zhao, J., Wiedmer, T., and Sims, P.J. (2002). Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase 1. *Blood* 99, 4030-4038.

Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W.F., Gragerov, A., Ogata, C.M., Gottesman, M.E., and Hendrickson, W.A. (1996). Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272, 1606-1614.

Zinkel, S.S., Ong, C.C., Ferguson, D.O., Iwasaki, H., Akashi, K., Bronson, R.T., Kutok, J.L., Alt, F.W., and Korsmeyer, S.J. (2003). Proapoptotic BID is required for myeloid homeostasis and tumor suppression. *Genes Dev* 17, 229-239.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.

Zoumbos, N.C., Gascon, P., Djeu, J.Y., and Young, N.S. (1985). Interferon is a mediator of hematopoietic suppression in aplastic anemia in vitro and possibly in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 188-192.

Zylicz, M., King, F.W., and Wawrzynow, A. (2001). Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *Embo J* 20, 4634-4638.

